

DIE BEDEUTUNG DER NIKOTINISCHEN ACETYLCHOLINREPTOREN IN ATOPISCHER DERMATITIS

FRIEDERIKE KINDT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Bedeutung der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren in atopischer Dermatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Friederike Magdalena Kindt
aus Herdecke

Gießen 2007

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt
und der Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. Ch. Reimer

1. Gutachter: PD Dr. V. Niemeier
 2. Gutachter: PD Dr. F. Blaes
- Tag der Disputation: 27. Mai 2008, Gießen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Haut	1
1.1.1. Die Epidermis	2
1.1.2. Die Dermis	4
1.1.3. Die Subcutis	5
1.1.4. Gefäße und Nerven der Haut	5
1.1.5. Adnexe (Hautanhangsgebilde)	7
1.1.6. Die Funktionen der Haut	10
1.2. Das cholinerge System	12
1.2.1. Synthese, Freisetzung und Abbau des Acetylcholins	12
1.2.2. Acetylcholinrezeptoren	13
1.2.3. Das cholinerge System der Haut	19
1.3. Die Atopische Dermatitis (AD)	21
1.3.1. Krankheitsbild und Morphe	22
1.3.2. Extrinsische und intrinsische Form der AD	24
1.3.3. Epidemiologie	25
1.3.4. Immunologie	26
1.3.5. Acetylcholin und atopische Dermatitis	28
1.4. Fragestellung	29
2. Material und Methoden	30
2.1. Das Patientenkollektiv	30
2.1.1. Einschlusskriterien für AD-Patienten	30
2.1.2. Atopie-negative Probanden	31
2.1.3. Ausschlusskriterien	31
2.2. Probengewinnung	32
2.3. Allgemeine Analyseverfahren	33
2.3.1. Histologische Begutachtung	33
2.3.2. Direkte und indirekte Immunhistochemie	34
2.3.3. RT-PCR	37
2.4. Immunologische Untersuchungen	41
2.4.1. IgE (Immunglobulin E)	41
2.4.2. Screening auf Inhalations- und Nahrungsmittelallergien	42

3. Ergebnisse	44
3.1. Fragebogen und immunologisches Screening	44
3.2. HE-Färbung	45
3.3. Immunhistochemie	47
3.3.1. nAChR- α 3-Untereinheit	47
3.3.2. nAChR- α 5-Untereinheit	48
3.3.3. nAChR- α 7-Untereinheit	49
3.3.4. nAChR- α 9-Untereinheit	50
3.3.5. nAChR- α 10-Untereinheit	50
3.4. Quantitative RT-PCR	51
3.4.1. Vergleich zwischen gesunder und AD-Haut	51
3.4.2. Vergleich zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut	52
3.4.3. Vergleich zwischen AD-Subtypen	53
4. Diskussion	60
4.1. Das cholinerge System der Haut	60
4.2. Nerven, Gefäße und Mastzellen	62
4.2.1. nAChR- α -Untereinheiten in Nervenfasern	63
4.2.2. nAChR- α -Untereinheiten in Blutgefäßen	64
4.2.3. nAChR- α -Untereinheiten in Mastzellen	65
4.3. nAChR- α -Untereinheiten in der Epidermis	66
4.3.1. α 3-Untereinheit	67
4.3.2. α 5-Untereinheit	68
4.3.3. α 7-Untereinheit	68
4.3.4. α 9-Untereinheit	69
4.3.5. α 10-Untereinheit	71
4.4. Schlussfolgerung	72
4.5. Klinische Relevanz	72
5. Zusammenfassung	74
5.1. Zusammenfassung (deutsch)	74
5.2. Abstract (english)	76
Literaturverzeichnis	78
A. Fragebogen	93
B. Bildteil	99
Danksagung	108
Publikationen	109

Abbildungsverzeichnis

1.1. Aufbau der Epidermis	3
1.2. Das Haar und seine Wurzelscheiden	7
1.3. Anhangsgebilde der Haut	9
1.4. Nikotinische Rezeptoren	17
1.5. Schema zur Genese der atopischen Dermatitis	22
1.6. Atopische Dermatitis bei einem Säugling	24
1.7. Beugennekzem	25
2.1. Das konfokale Laserscanning-Mikroskop	38
3.1. Boxplots der quantitativen RT-PCR der nAChR- α -Untereinheiten 3 und 5	57
3.2. Boxplots der quantitativen RT-PCR der nAChR- α -Untereinheiten 7 und 9	58
3.3. Boxplots der quantitativen RT-PCR der nAChR- α -Untereinheit 10	59
A.1. AD-Fragebogen	98
B.1. Lokalisation der alpha-3-Untereinheit	100
B.2. Lokalisation der alpha-5-Untereinheit	101
B.3. Lokalisation der alpha-7-Untereinheit	102
B.4. Lokalisation der alpha-9-Untereinheit	103
B.5. Lokalisation der alpha-10-Untereinheit	104
B.6. Mastzellen in läsionaler AD-Haut	105
B.7. Immunzellen im Bereich von Gefäßen der läsionaler AD-Haut	106
B.8. PCR der nAChR in der humanen Haut	107

Tabellenverzeichnis

1.1. Agonisten und Antagonisten cholinergere Rezeptoren	18
1.2. Acetylcholinrezeptoren (AChR) in gesunder humaner Haut	21
1.3. Diagnosekriterien der atopischen Dermatitis	23
1.4. Veränderungen des cholinergen Systems der Haut im Zusammen- hang mit dermatologischen Erkrankungen	28
2.1. Reagenzien für die Immunhistochemie	35
2.2. Verwendete Primärantikörper	35
2.3. Verwendete Sekundärantikörper	36
2.4. Verwendete Filter	37
2.5. Primerpaare für nAChR-Untereinheiten und das House-keeping-Gen	40
2.6. Reagenzien für die IgE-Bestimmung	42
3.1. Klinische Charakterisierung von AD-Probanden und hautgesunden Kontrollprobanden	46
3.2. $\alpha 3$ -mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut	54
3.3. $\alpha 5$ -mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut	54
3.4. $\alpha 7$ -mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut	55
3.5. $\alpha 9$ -mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut	55
3.6. $\alpha 10$ -mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut	56
3.7. Mittelwerte der mRNA-Expression in gesunder und AD-Haut . . .	56

Abkürzungsverzeichnis

ACh	- Acetylcholin
AChE	- Actylcholinesterase
AD	- atopische Dermatitis
BSA	- Bovines Serum Albumin
BuChE	- Butyrylcholinesterase
α -Bgt	- α -Bungarotoxin
Ca^{2+}	- Calciumion
cAMP	- cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	- cyclisches Desoxyribonucleosidtriphosphat
ChAT	- Cholinacetyltransferase
CHT1	- hochaffiner Cholintransporter
CLSM	- konfokales Laserscanning-Mikroskop
CT	- threshold cycle
DAG	- Diaminoglycerol
DF	- dermale Fibroblasten
DNA	- Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	- Desoxynucleosidtriphosphate
DZ	- dendritische Zelle
fx1	- nahrungsmittelallergenspezifische IgE-Antikörper
g	- Gramm
Gi-Protein	- inhibitorisches Glykoprotein
Gq-Protein	- Glykoprotein q
HCl	- Wasserstoffchlorid
HE-Färbung	- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Ig	- Immunglobulin
IHC	- Immunhistochemie
IL	- Interleukin
IP_3	- Inositoltrisphosphat
IR	- Immunreaktivität
K^+	- Kaliumion
K	- Kontrollproband
l	- Liter
M.	- Muskel

mAChR	- muskarinischer Acetylcholinrezeptor
Mg	- Magnesium
Mm.	- Muskeln
mMol	- Millimol
mRNA	- messenger-Ribonucleinsäure
n	- Anzahl der Proben
N.	- Nervus
Na ⁺	- Natriumion
nAChR	- nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	- Natriumchlorid
Nn.	- Nervi
NSS	- normales Schweineserum
qRT-PCR	- quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
OCT	- organische Kationentransporter
P	- AD-Proband
PBS	- phosphatgepufferte Elektrolytlösung
PFA	- Paraformaldehyd
RNA	- Ribonucleinsäure
rRNA	- ribosomale Ribonucleinsäure
SD	- Standardabweichung
SLURP	- secreted mammalianLy6/uPAR-related protein
SCORAD	- SCORing Atopic Dermatitis
s.o.	- siehe oben
Str.	- Stratum
sx1	- inhalationsallergenspezifische IgE-Antikörper
Taq	- Thermophilus aquarius
TH1	- T-Helfer-1-Zellen
Th2	- T-Helfer-2-Zellen
TNF	- Tumornekrosefaktoren
U	- Unit
VAChT	- vesikulärer Acetylcholintransporter
VOCC	- spannungsabhängiger Calciumkanal
z.B.	- zum Beispiel

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Die Haut

Das Organ Haut setzt sich aus vielen verschiedenen Zellarten zusammen. Dazu gehören Fibroblasten, LANGERHANS-Zellen, Zellen der Gefäßwand und Fettzellen, die embryologisch dem Mesoderm entstammen, sowie Keratinozyten, die aus dem Ektoderm hervorgehen. Weiterhin findet man hier auch Melanozyten und Nervenzellen, die embryonal aus der Neuralleiste stammen [HÖGER 2005].

Die Haut dient als mechanische und regulative Barriere zwischen Organismus und Umwelt und schützt so vor mechanischer, chemischer und thermischer Schädigung sowie vor ultravioletter Strahlung. Des Weiteren übernimmt sie wichtige Aufgaben in der Thermoregulation, der Vitamin-D-Synthese und dem Calcium-Stoffwechsel.

Die embryonale Entwicklung der Haut lässt sich in drei Abschnitte einteilen. Diese kann man grob den drei Schwangerschaftstrimena zuordnen: in der Organogenese (Tag 0-70) vollzieht sich die Entwicklung der Epidermis aus dem Ektoderm sowie die Entwicklung der Dermis überwiegend aus dem Mesoderm. Die beiden Keimblätter verbinden sich durch die Entwicklung der Basalmembran und der

Adnexen (Hautanhangsgebilde) [LOOMIS 2001].

Etwa in der 9. Schwangerschaftswoche beginnt die Histogenese (3.-5. Monat). Während dieser Zeit stratifiziert sich die Epidermis, die Dermis grenzt sich von der Subkutis ab und die Adnexen und Gefäße der Haut differenzieren sich. Im letzten Abschnitt der Entwicklung der Haut, der Reifung und Differenzierung (ab dem 5. Monat), erfolgt die histologische und funktionelle Reifung der Haut.

Die Differenzierung der verschiedenen Zellarten unterliegt komplexen multifaktoriellen Steuerungsmechanismen, die sich regional stark unterscheiden. Diese Steuerungsmechanismen können in vielfältiger Weise durch genetische und exogene Faktoren in ihrer Funktion gestört sein [HÖGER 2005].

1.1.1. Die Epidermis

Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten (von innen nach außen): Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum.

Das Stratum basale und das Stratum spinosum werden zum Stratum germinativum (Keimschicht) zusammengefasst, da die Zellen beider Schichten in der Lage sind, sich zu teilen. Die Wurzelfüßchen der Zellen im Stratum basale sind in die Basalmembran verankert. Dies dient zum einen der Stabilität der Verbindung der Epidermis mit der Unterlage und zum anderen der Vergrößerung der Stoffaustauschfläche mit dem gefäßreichen Bindegewebe der Dermis [FRITSCH 1993]. Da die Epidermis keine eigene Gefäße aufweist, ist sie auf die Diffusion von Nährstoffen aus dem Bindegewebe der Dermis (Stratum papillare, s.u.) angewiesen [ACKERMAN 1978] [LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990] [PINKUS und MEHREGAN 1976].

In das Stratum basale wandern die für die Pigmentbildung verantwortlichen Me-

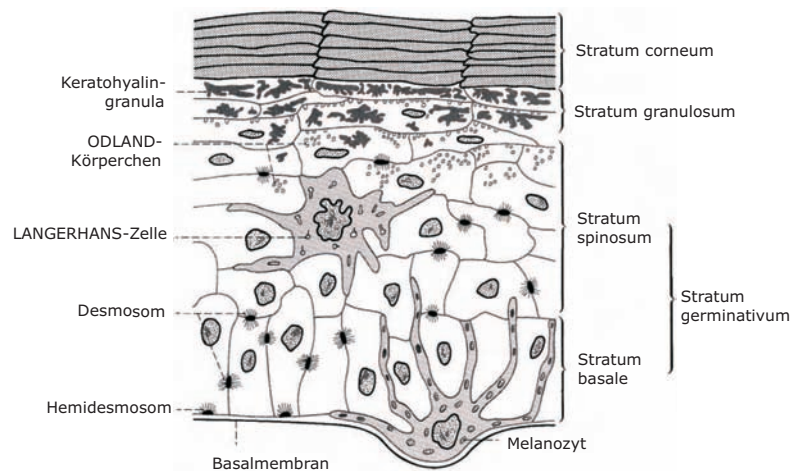


Abbildung 1.1.: Der Aufbau der Epidermis (modifiziert nach Anatomie Band II, Benninghoff [FRITSCH 1993]).

lanozyten ein. Mit ihren Fortsätzen bilden sie ein Netzwerk und können so 4-12 Basalzellen erreichen. Um den Bedarf an Melanin ein Leben lang zu sichern, können sich Melanozyten in der Haut teilen [HÖGER 2005].

Bei den suprabasal gelegenen LANGERHANS-Zellen handelt es sich um dendritische Zellen mesenchymaler Herkunft, die dem Monozyten-Makrophagen-System zugerechnet werden. Sie haben phagozytierende Eigenschaften und vermitteln u.a. die Antigenpräsentation bei epikutaner Sensibilisierung. Im Stratum basale des Stratum germinativum findet man die MERKEL-Zellen. Sie sind etwas größer als die Keratinozyten und mit letzteren über Desmosomen verbunden. Sie gehören zu den Mechanorezeptoren der Haut und werden durch Formänderungen der Keratinozyten aktiviert. Durch eine flache Nervenendplatte an der Unterseite der MERKEL-Zelle besteht Verbindung zu einer sensiblen Nervenfaser, die nervale Signale weiterleitet [HARTSCHUH et al. 1986].

Die im Stratum basale zylindrisch geformten Keratinozyten flachen im Stratum spinosum allmählich immer mehr ab und liegen dann schichtweise parallel zur Hautoberfläche. Auf das Stratum germinativum folgt das Stratum granulosum (Körnerschicht). Der Name ergibt sich aus den, während des Verhornungspro-

zesses paraplasmatisch entstehenden Keratohyalin-Körnchen. Je nach Stärke der Verhornung zeigen sich zwischen 1-5 Schichten abgeplatteter Zellen. Es lassen sich bereits Anzeichen des allmählichen Zelluntergangs feststellen: die Mitochondrien gehen verloren und der Zellkern verkleinert sich. Das Stratum lucidum findet man in der stark verhornten Leistenhaut. Es besteht aus mehreren Schichten plattspindelförmiger Zellen, deren Kerne nicht mehr anfärbbar sind. Das Stratum corneum (Hornschicht) unterscheidet sich interindividuell sowie in seiner Dicke je nach Beanspruchung des jeweiligen Hautareals. Die Zellen des Stratum corneum sterben im Laufe der Verhornung durch einen geregelten Zelltod ab (Apoptose). Der Zellkern wird hierbei zunehmend pyknotisch, um am Ende in den oberen Schichten des Stratum corneum ganz zu verschwinden. Die entstandenen platten Hautschüppchen schilfern sich ständig ab und werden dann aus dem Stratum germinativum regeneriert [WRIGHT et al. 1983].

1.1.2. Die Dermis

Die Dermis (Lederhaut) wird in das an die Epidermis grenzende lockere Stratum papillare und das darunter liegende derbe Stratum reticulare unterteilt. Das Stratum papillare besteht an seiner Grenze zur Epidermis aus einem dichten Geflecht aus Kollagenfasern sowie retikulären und elastischen Fasern. Außerdem finden sich hier zahlreiche Kapillarschlingen, die aus den subpapillären Gefäßen entspringen und der Versorgung der gefäßlosen Epidermis dienen. In der Umgebung der Blutgefäße findet man gehäuft freie Zellen wie Makrophagen und Mastzellen. Auch Nervenfasern und Meißner-Tastkörperchen sind in den Papillen der Dermis zu finden. Die mechanischen Eigenschaften der Haut sind in erster Linie dem Stratum reticulare zuzuschreiben. Es ist relativ zellarm und wird von starken kollagenen Faserbündeln durchzogen. Diese bilden ein Maschennetz, das sich bei Dehnung verzieht und nach Beendigung der Dehnung durch elastische Fasern

wieder zurückgestellt wird [BREATHNACH 1971] [MONTAGNA und PARAKKAL 1974].

1.1.3. Die Subcutis

Die Subcutis dient der Verbindung der Haut mit dem darunter liegenden Gewebe (Muskelfaszien, Periost, Perichondrium). Sie besteht vorwiegend aus lockerem, lamellärem Bindegewebe. Ihre Verschieblichkeit gegenüber der darüber liegenden Haut wird durch kollagene Bindegewebsstränge eingeschränkt.

Oft ist Fettgewebe in die Subcutis eingelagert (Unterhautfettgewebe). Die Menge sowie die Beschaffenheit des Unterhautfettgewebes variieren je nach Geschlecht, Alter und Körperteil. Seine Funktion besteht in der Erhaltung der Körpertemperatur und der Verschieblichkeit der Haut gegenüber anderen Geweben [FRITSCH 1993] [SCHIEBLER et al. 1997].

1.1.4. Gefäße und Nerven der Haut

Die Arterien und Venen der Haut bilden an der Grenze zwischen Dermis und Subcutis das tiefe subcutane Gefäßnetz. Von hier aus werden das mittlere Gefäßnetz in der Dermis und das subpapilläre Gefäßnetz an der Epidermis-Dermis-Grenze versorgt. Das subpapilläre Gefäßnetz ernährt die Epidermis durch die in die Koriumpapillen ziehenden Kapillarschlingen.

An den Gefäßen der Haut verlaufen sowohl autonome (sympathische und im Bereich des Kopfes auch parasympathische Nervenfasern) als auch sensorische Nervenfasern. Die Mikrozirkulation der Haut wird durch ein Zusammenspiel zwischen autonomen und sensorischen Fasern reguliert [RUOCCO et al. 2002].

Das Lymphgefäßsystem der Haut dient dem Abtransport flüssiger und partikulärer Substanzen aus der Dermis. Die Lymphe sammelt sich in den Extrazellular-

räumen an. In den dermalen Papillen kann sie dann über die in diesem Bereich kolbig aufgetriebenen Lymphgefäße in tiefer liegende regionäre Lymphknoten abfließen [RYAN 1973] [RYAN 1983] [KRETSOS und KASTING 2005] [BOLLINGER 1993].

Bei der Innervation der Haut werden sympathische und sensorische Nervenfasern unterschieden. Die sympathischen Nervenfasern machen nur einen kleinen Teil der Hautnerven aus [SCHIEBLER et al. 1997] und versorgen durch vasomotorische, sekretorische und trophische Fasern die Gefäße, die Drüsen, die Mm. arrectores pilorum der Haare und die Fettzellen. Die ekkrinen Schweißdrüsen der Haut werden von cholinergen Fasern des Sympathikus versorgt [ERNSBERGER und ROHRER 1999]. Die parasympathische Innervation der Haut dient, wie oben bereits erwähnt, der Vasomotorik. Die sensible Innervation der Haut bildet das Bindeglied zwischen der Außenwelt und dem menschlichen Körper. Über freie Nervenendigungen und Endkörperchen werden verschiedenen Sinnesempfindungen (u.a. Berührung, Druck, Vibration, Schmerz und Temperatur) wahrgenommen [GREENSPAN und LAMOTTE 1993]. Die freien Nervenendigungen findet man im Stratum papillare, intraepithelial sowie als longitudinale und zirkuläre Fasern an der Wurzelscheide der Haare. Es handelt sich hierbei um frei endende Axone, die von einer häufig unterbrochenen Hülle aus SCHWANN-Zellen umgeben sind. Sie werden mit der Fortleitung von mechanischen, thermischen und schmerzhaften Reizen in Verbindung gebracht [REZNIK 1996] [SPRAY 1986]. Bei den Endkörperchen handelt es sich um spezifische Rezeptorstrukturen, die jeweils aus einem neuronalen und einem non-neuronalen Anteil zusammengesetzt sind. Obwohl ihre Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird davon ausgegangen, dass es sich um Mechanorezeptoren handelt. Die wichtigsten Endkörperchen der Haut sind die MERKEL-Zellen, die MEISSNER-Tastkörperchen, die VATER-PACINI-Lamellenkörperchen und die RUFFINI-Körperchen. MERKEL-Zellen findet man im Stratum germinativum der Epidermis. Sie dienen der Druckempfindung. Bei den MEISSNER-Tastkörperchen handelt es sich dagegen im Be-

rührungsrezeptoren, die besonders zahlreich in der Haut von Finger- und Zehenspitze vorkommen. Sie liegen subepidermal im bindegewebigen Stratum papillare und sind durch Kollagenfibrillen mit der Epidermis verbunden. Die VATER-PACINI-Lamellenkörperchen sind Rezeptoren für die Vibrationsempfindung. Sie bestehen aus mehreren zwiebelschalenartig angeordneten Bindegewebszellen, die eine Nervenendigung, das sog. Rezeptorterminal umgeben. Lokalisiert sind VATER-PACINI-Lamellenkörperchen hauptsächlich in der Subcutis der Hand- und Fußflächen, aber auch in anderen Geweben des menschlichen Körpers, wie z.B. Blutgefäßen, Pankreas (Bauchspeicheldrüse) und Periost (Knochenhaut) [VEGA et al. 1996]. Die RUFFINI-Körperchen gelten als langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren der Haut. Sie befinden sich im Stratum reticulare der Dermis sowie an den Haaren. Dort bilden sie einen offenen Zylinder, der von einer perineuralen Kapsel umgeben wird. In die Kapsel ziehen kollagene Fasern, die an den Nervenendigungen verankert sind und so den Dehnungszustand der Haut an die Nerven übertragen können [MUNGER und IDE 1988] [SCHIEBLER et al. 1997].

1.1.5. Adnexe (Hautanhangsgebilde)

Bei den Haaren unterscheidet man die unter der Hautoberfläche befindliche Haarwurzel (Radix) und den frei aus der Haut herausragenden Haarschaft (s. Abb. 1.2, S. 7). Die Radix sitzt dabei einer Papille auf, welche Matrixzellen, eine Kapillarschleife und Melanozyten beinhaltet. Aus den Matrixzellen werden die Haare generiert, die Kapillaren dienen der Ernährung des Haares und die Melanozyten geben dem Haar seine Farbe. Der das Haar umgebende Haarfollikel wird durch die bindegewebige Wurzelscheide sowie die äußere (Fortsetzung des Stratum germinativum) und die innere epitheliale Wurzelscheide (bestehend aus Scheidencuticula, Huxley-Schicht und Henle-Schicht) gebildet. Die innere epitheliale Wurzelscheide erstreckt sich hierbei nur bis auf Höhe der Talgdrüsenmündung. Ab hier wird



Abbildung 1.2.: Die Schichten des Haares und seiner Wurzelscheiden (modifiziert nach [FRITSCH 1993])

sie durch das sich absenkende Stratum corneum ersetzt. Mit dem bindegewebigen Anteil der Wurzelscheide stehen die Zellen des sympathisch innervierten M. arrector pili in Verbindung. Sie liegen auf der Seite des flachen Winkels zwischen Haar und Hautoberfläche und inserieren mit mehreren elastischen Sehnen im subpapillären Bindegewebe der Dermis. Hier liegt außerdem die das Haar versorgende Talgdrüse (Glandula sebacea). Sie befindet sich etwas oberhalb des Muskelansatzes.

Man unterscheidet die zarten marklosen Lanugohaare (Arm- und Beinbehaarung) von den kräftigen Sekundärhaaren (Kopfhaar) bzw. Terminalhaaren (Schambe-

haarung, Achselhaare und beim Mann z.T. stärkere Behaarung an Brust, Beinen und Armen). Während sich die Lanugobehaarung bereits in der Fetalzeit ausbildet tritt die Terminalbehaarung erst durch hormonellen Einfluss nach der Pubertät auf [JUNG und MOLL 2003] [EBLING 1987] [KOBORI und MONTAGNA 1975] [MATOLTSY et al. 1986].

Am menschlichen Körper lassen sich mehrere Arten von Drüsen (Glandulae)

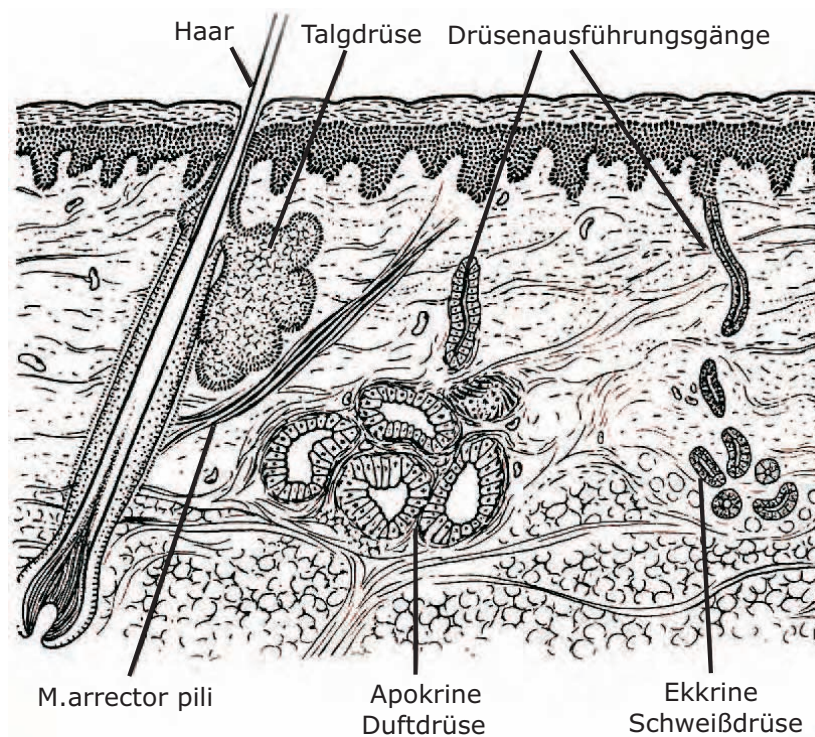


Abbildung 1.3.: Die Anhangsgebilde der Haut (modifiziert nach [SCHIEBLER et al. 1997])

unterscheiden. Hier werden nur die Talg- und die Schweißdrüsen (Glandulae sudoriferae) erwähnt. Die Schweißdrüsen können noch in die kleinen ekkrinen und die größeren apokrinen Schweißdrüsen unterteilt werden. Während man die ekkrinen Schweißdrüsen in allen Körperregionen findet, sind die apokrinen Drüsen (Duftdrüsen) auf folgende Bereiche begrenzt: Warzenhof der Brustdrüse, Achselhöhle, Leisten- und Schamgegend, After, Vestibulum nasi, Wimpernwurzeln und Ohr. Schweißdrüsen bestehen aus einem sezernierenden Endstück, das in der Tie-

fe der Dermis liegt und den Schweiß produziert, und einem Ausführungsgang, der das Sekret anschließend an die Körperoberfläche befördert. Die Zellen der ekkri-
nen Drüsen bleiben bei dem Sekretionsvorgang vollständig erhalten. Ihr Sekret
ist sauer und wirkt antibakteriell. Ein Teil der Zellen apokriner Drüsen wird da-
gegen bei der Sekretion mit abgestoßen. Da das Sekret der Duftdrüsen alkalisch
und fettig ist, fehlt dort der Säureschutzmantel der Haut, was zu einer gesteiger-
ten Inzidenz von Schweißdrüsenentzündungen führt [SCHIEBLER et al. 1997].

Die Talgdrüsen gehören zu den holokrinen Drüsen, d.h. hier werden bei der Sekre-
tion ganze Zellen abgestoßen. Nachdem die Drüsenzellen fettig degeneriert sind
und apoptotisch geworden sind, werden sie zum Sekret der Drüse. Meist treten
Talgdrüsen in Verbindung mit Haaren auf, sie existieren aber auch unabhängig
davon. Münden sie in den Haarfollikel, so verläuft ihr Ausführungsgang oberhalb
des M. arrector pili. Die Dichte der Talgdrüsen am Körper ist sehr unterschied-
lich: Besonders zahlreich sind sie an Nase, Ohr, Rücken und Brust während sie
an Hohlhand, Fußsohle und Nagelgliedstreckseite ganz fehlen [WALDEYER 1969].
Die Endglieder von Fingern und Zehen werden von den Nägeln (Ungues) bedeckt.
Diese mehr oder weniger gewölbten Hornplatten dienen als Schutz der Endglieder
und als Widerlager für den Tastapparat der Fingerbeere [WALDEYER 1969].

Der Nagel wird in die Abschnitte Nagelwurzel, Nagelkörper und Nagelrand ein-
geteilt. Die Nagelwurzel (Radix unguis) liegt im Nagelwall, einer Hauttasche.
Von hier aus schiebt sich das verhornte proximale Nagelfalz (Eponychium) über
den Nagel. Wie an der Epidermis lassen sich am Nagel eine Hornschicht und eine
Keimschicht unterscheiden. Im proximalen Teil der Keimschicht findet das Nagel-
wachstum statt. Das Nagelbett (Hyponychium) liegt unter der Keimschicht und
entspricht der Dermis der Haut. Der Nagel selbst hat keine Eigenfarbe. Färbun-
gen in diesem Bereich kommen durch die in den Leisten des Nagelbettes liegenden
Kapillarschlingen zustande [FRITSCH 1993].

1.1.6. Die Funktionen der Haut

Die Haut bildet sowohl den Kontaktpunkt als auch die Barriere des Körpers zur Außenwelt. Durch Tastsinn und Temperaturempfindung kann die Umwelt wahrgenommen werden. Gleichzeitig bietet die Haut dem Körper Schutz vor den von außen kommenden Noxen. Eine intakte Haut vermindert den transepidermalen Wasserverlust, verhindert das Eindringen von Mikroorganismen in den Körper, beteiligt sich an der Thermoregulation und bietet mechanischen und chemischen Schutz [HÖGER 2005]. Für die Barrierefunktion der Haut spielt das Stratum corneum die größte Rolle. Sein ziegelsteinartiger Aufbau wird durch im Golgi-Apparat des Stratum granulosum gebildete Lipide verstärkt [LAMPE et al. 1983]. Diese werden zunächst in Granula gespeichert und dann in den Interzellularraum des Stratum corneum abgegeben. Die wichtigsten Lipide des Stratum corneum sind die Ceramide. Weiterhin spielt das von den Talgdrüsen abgegebene Sekret eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Hautbarrierefunktion.

Haben Mikroorganismen die Hautbarriere dennoch durchbrochen, so wird zunächst das unspezifische Immunsystem der Haut aktiviert. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems (Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ)) können nach Prozessierung des Antigens der Mikroorganismen eine sekundäre Aktivierung des spezifischen Immunsystems bewirken [KRETSOS und KASTING 2005] [OLSZEWSKI 2003].

Die Thermoregulation der Haut wird durch die Gefäße und die Schweißdrüsen bewerkstelligt. Durch Weitstellung der Gefäße und Schweißsekretion kann der Körper Wärme abgeben, während er durch Konstriktion der Gefäße die Wärmeabgabe drosseln kann [LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990].

Die antimikrobielle Schutzwirkung kommt durch verschiedenen Faktoren zustande. Zum einen trägt die intakte Barriere der Epidermis mit dem Stratum corneum, den Lipiden und dem sauren pH-Wert von 5,5 dazu bei, dass kein Keim eindringen kann, zum anderen kontrollieren die apathogenen saprophytischen Keime der

Haut das Wachstum anderer Keime und dienen so der Abwehr gegen pathogene Spezies. Einen zusätzlichen Schutz bieten die antimikrobiellen Peptide aus der Familie der Defensine und Cathelicidine. Sie werden von den Keratinozyten gebildet und sind auf der Haut ubiquitär vorhanden [LAMPE et al. 1983]. Neben der ständigen basalen Synthese und Sekretion können auch Traumata ihre Bildung und Freisetzung induzieren [LUND et al. 1997]. Das antimikrobielle Spektrum dieser Peptide umfasst grampositive und gramnegative Bakterien sowie einige Viren und Pilze [HÖGER 2005].

1.2. Das cholinerge System

1.2.1. Synthese, Freisetzung und Abbau des Acetylcholins

Acetylcholin (ACh) dient in vielen Zellen des menschlichen Körpers als Botenstoff. Neben seiner Funktion als Neurotransmitter des Sympathikus und Parasympathikus findet man ACh auch in vielen non-neuronalen Geweben [WESSLER et al. 1998] [WESSLER et al. 1999] [LIPS et al. 2003] (s.a. Kap. 1.2.3, S.19). ACh wird aus Cholin und Acetyl-CoA gebildet. ACh produzierende Zellen besitzen den hochaffinen Cholintransporter (CHT1), da Cholin die Zellmembran nicht permeieren kann [OKUDA und HAGA 2000]. Es handelt sich hierbei um einen natriumabhängigen Transporter aus 12 Transmembrandomänen [OKUDA und HAGA 2000]. Die Aufnahme von Cholin in die Zelle ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ACh-Synthese [KUCHAR und MURRIN 1978]. Acetyl-CoA entsteht in der Zelle im Citrat-Zyklus, bei der Cholesterinbiosynthese und der Steroidbiosynthese und wird von den Mitochondrien in das Cytoplasma abgegeben. Das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) ist in der Zelle für die Synthese des Botenstoffs ACh zuständig. Kodiert wird die ChAT durch ein einziges Gen, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 10 befindet [GROSMAN et al. 1995]. Da die Affinität

der ChAT zu Butyryl-CoA und Propionyl-CoA genauso hoch ist wie zu Acetyl-CoA, kann dieses Enzym auch Butyrylcholin und Propionylcholin bilden [ROSSIER et al. 1977] [WESSLER et al. 1998]. Zusätzlich zur ChAT kann auch die in den Fettstoffwechsel integrierte Carnitinacetyltransferase ACh bilden [TUCEK 1982].

In Zellen neuronaler Herkunft wird ACh in Vesikeln gespeichert. Die Aufnahme von ACh in die Speichervesikel erfolgt über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Wie der CHT1 besteht auch der VACHT aus 12 Transmembrandomänen. Er transportiert ACh im Antiport mit H^+ -Ionen in die Vesikel [ERICKSON et al. 1994]. Über die Speicherung von ACh in non-neuronalen Geweben ist bis jetzt nichts bekannt.

Soll ACh aus Nervenendigungen freigesetzt werden, verschmelzen die Speichervesikel mit der Zellmembran und es kommt zur Ca^{2+} -abhängigen Exozytose des Vesikelinhaltes. Für die humane Plazenta und das Bronchialepithel sind organische Kationentransporter (OCT) beschrieben worden, über die ACh ebenfalls transportiert werden kann [WESSLER und KIRKPATRICK 2001]; [LIPS et al. 2005]. Auch die Freisetzung über Membranporen, wie sie für die Zitterrochen beschrieben wurde, wird für humane Gewebe diskutiert. Im elektrischen Organ des Zitterrochens ist ein an eine Membranpore gebundenes Protein namens Mediatophor nachgewiesen worden [ISRAEL et al. 1997]. Es entspricht der C-Untereinheit einer lysosomalen Protonenpumpe des Menschen [NEZU et al. 1992].

Der Abbau des ACh erfolgt durch zwei verschiedene Enzyme: Die spezifische Acetylcholinesterase (AChE) und die Butyrylcholinesterase (BuChE). Das Wirkungsmaximum der AChE liegt bei geringen, das der BuChE bei hohen ACh-Konzentrationen [KOELLE et al. 1950]. Die AChE kann sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen und tritt an die Membran gebunden oder als lösliches Enzym auf. Verschiedene Isoformen entstehen durch alternatives Splicen des gleichen Genproduktes [TAYLOR et al. 1994].

1.2.2. Acetylcholinrezeptoren

ACh kann als Transmitter an zwei unterschiedliche Rezeptorklassen binden. Man differenziert nach den jeweiligen spezifischen Agonisten nikotinische (nAChR) und muskarinische (MR) ACh-Rezeptoren, die sich in Struktur, Funktion und Wirkung unterscheiden.

Nikotinische ACh-Rezeptoren: Bei den nAChR handelt es sich um Hetero- oder Homopentamere, die einen ligandengesteuerten Ionenkanal bilden. Die Untereinheiten bestehen jeweils aus einem langen extrazellulären N-terminalen Bereich, vier Transmembrandomänen (M1-4), wobei die Transmembrandomänen M3 und M4 durch einen großen zytoplasmatischen Bereich voneinander getrennt sind, und einem kurzen extrazellulären C-Terminus (s.a. Abb. 1.4, S.17). Die nAChR werden in den neuronalen und den muskulären Typ unterteilt. Der muskuläre Typ kann aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ und ε bestehen und kommt an der motorischen Endplatte vor, während der neuronale Typ, anders als der Name vermuten lässt, auch in vielen non-neuronalen Gewebe exprimiert wird [LINDSTROM 1996] [LENOVERE et al. 2002]. Die nAChR vom neuronalen Typ können bei Säugtieren aus den α -Untereinheiten $\alpha 2$ -7, 9 und 10 sowie den β -Untereinheiten $\beta 2$ -4 zusammengesetzt sein [LINDSTROM 1996] [VERBITSKY et al. 2000]. Die mRNA-Expression und Zusammensetzung der Rezeptoren unterscheidet sich je nach Körperregion und Gewebe. Die Stöchiometrie der Rezeptoruntereinheiten bedingt die Funktion, Ionenpermeabilität und pharmakologische Charakteristik der jeweiligen Rezeptorsubtypen (s.a. Tab. 1.1, S.18). Jeder nAChR muss mindestens zwei α -Untereinheiten besitzen, da nur sie Bindungsstellen für ACh ausbilden und so Signale übermitteln können. Die homopentameren nAChRs, welche aus fünf α -Untereinheiten bestehen, tragen somit fünf identische Bindungsstellen, während heteromere Rezeptoren aus zwei α - und drei β -Untereinheiten nur zwei Bindungsstellen aufweisen [EDELSTEIN und CHANGEUX 1998] [CORRINGER et al. 2000] (s.a. Abb. 1.4, S.17). Die Funktion der β -Untereinheiten besteht in der

Regulation der Bindung des Liganden an den Rezeptor und seiner Dissoziation vom Rezeptor [PAPKE et al. 1993] [LENOVERE et al. 2002] [LIND et al. 2001].

Die neuronalen nAChR lassen sich noch einmal untergliedern in solche, die α -Bungarotoxin (α Bgt) binden, und in solche, die α Bgt nicht binden (s.a. Tab. 1.1, S.18). Die α Bgt bindenden nAChR werden aus den Untereinheiten $\alpha 7$, 8, 9 und 10 gebildet [LINDSTROM 1995] [LINDSTROM 1996] [ELGOYHEN et al. 1994]. Die Untereinheiten $\alpha 7$ -9 können als Homopentamere auftreten. In Untersuchungen an nAChR-Untereinheiten exprimierenden Oozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass $\alpha 7$ -Untereinheiten mit $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Untereinheiten Heteropentamere bilden können [KHIROUG et al. 2002]. Abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten ändert sich auch die Affinität der nAChR zu ACh und seinen Agonisten und Antagonisten [PALMA et al. 1999] [KHIROUG et al. 2002]. Die $\alpha 8$ -Untereinheit wurde bis jetzt nur im Nervensystem von Hühnern gefunden, wo sie auch als Heteropentamer mit $\alpha 7$ auftritt [GOTTI et al. 1994] [KEYSER et al. 1993]. Rezeptoren, welche die $\alpha 9$ -Untereinheit beinhalten, treten extraneuronal auf. Diese nAChR haben ein ungewöhnliches pharmakologisches Profil, da sie sowohl Affinität für Muskarin als auch für Nikotin aufweisen [ELGOYHEN et al. 1994]. Die $\alpha 10$ -Untereinheit kann mit $\alpha 9$ [SGARD et al. 2002] [ELGOYHEN et al. 2001] und wahrscheinlich auch mit $\alpha 7$ und $\beta 1$ Heteropentamere bilden [KURZEN 2004].

Die nAChR, die kein α Bgt binden, bestehen aus den Untereinheiten $\alpha 2$, 3, 4, 5 und 6, sowie aus $\beta 2$, 3 und 4 [SARGENT 1993] [MCGEHEE und ROLE 1995]. Der im Gehirn vorherrschende Typ dieser nicht α Bgt-bindenden Rezeptoren ist ein Heteropentamer aus $\alpha 4$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten [WHITING und LINDSTROM 1988]. Diese nAChR besitzen eine sehr hohe Affinität zu Nikotin. Chronische Exposition gegenüber Nikotin führt zu einer vermehrten Expression des $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [SCHWARTZ und KELLAR 1985] [BENWELL et al. 1988] [FLORES et al. 1992]. Die erhöhte Expression dieses nAChR wurde als Antwort der Neurone auf die Akkumulation von desensibilisierten Rezeptoren gedeutet [WONNACOTT

1990]. Die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$ können nur dann funktionsfähige Rezeptoren bilden, wenn sie in Kombination mit anderen α - und β -Untereinheiten auftreten [LINDSTROM 2000]. $\alpha 5$ wurde in Kombination mit $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ und $\alpha 4\beta 2$ gefunden, während $\beta 3$ zusammen mit den $\alpha 3\beta 4$ -Untereinheiten auftritt. Verschiedene Untersuchungen legen die Vermutung nah, dass die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$ nicht direkt in die Bildung der Liganden-Bindungsstellen einbezogen sind, sondern eher eine kontrollierende Wirkung in Bezug auf Ionenpermeabilität und evtl. die Rezeptorlokalisation haben [RAMIREZ-LATORRE et al. 1996] [WANG et al. 1996] [YU und ROLE 1998] [GROOT-KORMELINK et al. 1998]. Rezeptoren, die die Untereinheit $\alpha 6$ beinhalten, haben einen komplexen Aufbau. Die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ und $\beta 4$ können gemeinsam mit $\alpha 6$ funktionsfähige Rezeptoren bilden [KURYATOV et al. 2000].

Die Aktivierung der nAChR führt über eine Konformationsänderung zur vermehrten Durchlässigkeit des Rezeptors für bestimmte Kationen (z.B. Ca^{2+} , Na^{+}). Homopentamere sind hauptsächlich für Ca^{2+} und weniger für Na^{+} permeabel [DAJAS-BAILADOR et al. 2002], während Heteropentamere, die die $\alpha 3$ -Untereinheit beinhalten, auch für Ionen wie Na^{+} und K^{+} durchlässig sind [LUKAS et al. 1999] [MILLAR 2003]. Durch den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle kommt es zu einer Änderung des Membranpotentials und zum anderen über komplexe intrazelluläre Signalwege zur Beeinflussung des Zellstoffwechsels, wie z.B. der Transmitterfreisetzung [WONNACOTT 1997] und der Genexpression [GUEORGUIEV et al. 1999]. Der nAChR-vermittelte Einstrom von Natriumionen führt zur Depolarisation der Zellmembran, welche wiederum die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VOCCs) mit Calciumioneneinstrom zur Folge hat. Durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} kann so der Effekt eines primären Ca^{2+} -Einstroms verstärkt werden [RATHOUZ und BERG 1994] [DAJAS-BAILADOR et al. 2002].

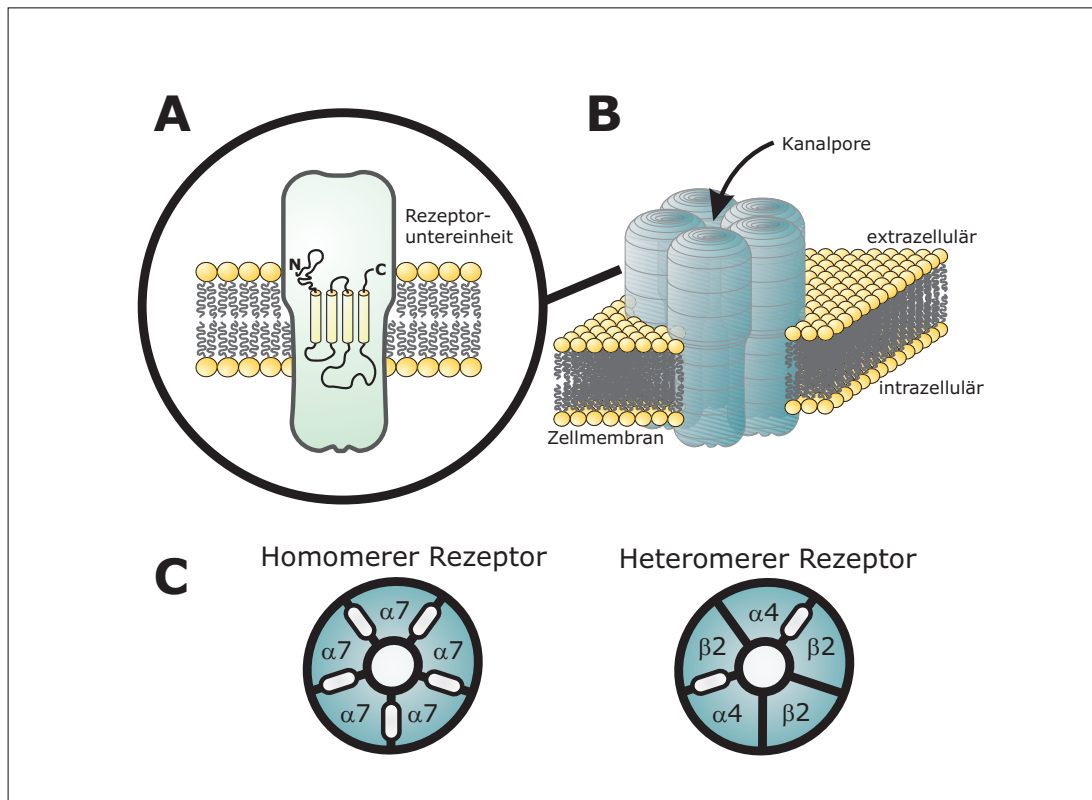


Abbildung 1.4.: Die nikotinischen Rezeptoren: Organisation und Struktur des nAChR. (A) schematische Darstellung der vier Transmembrandomänen einer Rezeptoruntereinheit mit dem extrazellulären N-Terminus, den hydrophoben Transmembrandomänen (M1-M4) und der großen intrazellulären Schleife. (B) pentamerer Aufbau des nAChR aus fünf Rezeptoruntereinheiten. (C) Querschnitt durch einen nAChR links ein homomerer nAChR aus fünf $\alpha 7$ -Untereinheiten, rechts ein heteromerer nAChR aus zwei $\alpha 4$ - und drei $\beta 2$ -Untereinheiten. (Modifiziert nach [GOTTI und CLEMENTI 2004])

Muskarinische ACh-Rezeptoren: Die M-mAChR bestehen aus einem einzigen G-Protein-gekoppelten Glykoprotein, welches sieben Transmembrandomänen bildet [WESS 1996] [CAULFIELD und BIRDSALL 1998]. Bisher sind fünf Subtypen identifiziert worden (mAChR1-5). Durch Stimulation der M1-, M3- und M5-mAChR kommt es Gq-Protein vermittelt über eine Aktivierung der Phospholipase C β [FELDER 1995] zur Bildung der Signalmoleküle Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) und zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺. Die M2- und M4-mAChR sind an G-Proteine der G_i-Familie gekoppelt. Sie hemmen über die Adenylatzyklase die Synthese des intrazellulären Signalmoleküls

cAMP [FELDER 1995] [CAULFIELD und BIRDSALL 1998].

Die Expression verschiedener MR kann bis auf wenige Ausnahmen nicht bestimmten Organen oder Geweben zugeordnet werden. In einigen Geweben (z.B. glatte Muskulatur und Epithelien) konnten verschiedenen MR-Subtypen in einer Zelle nachgewiesen werden [HABERBERGER und BODENBENNER 2000] [DHEIN et al. 2001].

1.2.3. Das cholinerge System der Haut

Viele Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass die Haut nicht nur Ziel für verschiedenen Hormone und Neurotransmitter ist, sondern dass sie auch in der Lage ist, unterschiedliche Stoffe dieser Gruppen zu bilden und freizusetzen [ZOUBOULIS 2000] [SCHALLREUTER 1997] [FUCHS 1990]. Auch ACh gehört zu diesen Substanzen [GRANDO et al. 1993]. Das cholinerge System der Haut spielt eine entscheidende Rolle für viele Funktionen der Haut, wie z.B. die Differenzierung der Keratinozyten, die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion, die Schweiß- und Talgsekretion sowie die Mikrozirkulation [LONGMORE et al. 1985] [SMITH 1992] [SCHAFFER et al. 2001] [ARREDONDO et al. 2002].

Außer den die Schweißdrüsen und Blutgefäße versorgenden cholinergen Nervenfasern besitzen auch die Keratinozyten der Epidermis [GRANDO et al. 1993], die Fibroblasten und die Endothelzellen der Gefäße [NGUYEN et al. 2000] [WESSLER und KIRKPATRICK 2001] Komponenten des cholinergen Systems. Für die Keratinozyten sind ACh als Cytotransmitter, die Enzyme ChAT und AChE [GRANDO 1997] [WESSLER und KIRKPATRICK 2001], cholinerge Rezeptoren der Klassen nAChR [GRANDO et al. 1995a] und mAChR [PERCHELLET et al. 1982] sowie CHT1 [HABERBERGER et al. 2002] nachgewiesen worden.

Die cholinergen Rezeptoren der Haut zeigen inter- und intraindividuell Schwankungen in ihrer Expressionsstärke [KURZEN 2004]. Als beeinflussende Faktoren

Rezeptor	Agonisten	Antagonisten
$\alpha\beta\delta\varepsilon$ -(Muskel)nAChR	ACh, Carbachol, Epibatidine	α -Bungarotoxin, Curare,
$\alpha 3$ -nAChR	ACh, Carbachol, Epibatidine	κ -Bungarotoxin, Hexametonium, (Atropin)
nAChR		Mecamylamin
$\alpha 3$ - und $\alpha 7$ -nAChR	Nikotin	Mecamylamin, Curare
$\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -nAChR	Cholin	α -Bungarotoxin
$\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -nAChR	ACh, Carbachol	Strychnin, Atropin
mAChR	ACh, Carbachol, Muskarin, Metacholin	Atropin, Scopolamin
M1-mAChR	Mambatoxin-2 (MT-2)	Pirenzipin, MT-7, MT-1
M2-mAChR	keine selektiven Agonisten bekannt	kein selektiver Antagonist bekannt
M3-mAChR	MT-2	Darifenacin
M4-mAChR	keine selektiven Agonisten bekannt	Tropikamid
M5-mAChR	MT-2	kein selektiver Antagonist bekannt

Tabelle 1.1.: Beispiele für pharmakologisch wirksame Agonisten und Antagonisten an nikotinischen (nAChR) und muskarinischen (mAChR) Rezeptoren (modifiziert nach [KURZEN 2004])

werden Alter, Lichtexposition, Tabakkonsum, Körperregion und Atopien angenommen [KURZEN et al. 2004] [ARREDONDO et al. 2005]. Die auf den Keratinozyten befindlichen nAChR können die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ -7, $\alpha 9$ und 10 sowie $\beta 1$, 2 und $\beta 4$ enthalten [RAFTERY et al. 1980] [GRANDO et al. 1995a] [NGUYEN et al.

2001] [SGARD et al. 2002] [ARREDONDO et al. 2002] [KURZEN et al. 2004]. Die aus den Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, sowie $\beta 1$, 2 und 4 gebildeten Heteropentamere werden im Stratum germinativum und Stratum granulosum sehr variabel exprimiert. Zusammen mit der $\alpha 9$ -Untereinheit und dem M3-mAChR spielt die $\alpha 3$ -Untereinheit eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Keratinozyten [NGUYEN et al. 2004]. Außerdem wird der Effekt von Nikotin auf die Haut hauptsächlich durch die $\alpha 3$ -Untereinheit vermittelt [ARREDONDO et al. 2003]. Die $\alpha 7$ -Expression sowie die ACh- und Ca^{2+} -Konzentration sind im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum am stärksten [DENDA et al. 2003]. Die homopentameren $\alpha 7$ -nAChR scheinen eine entscheidende Rolle für die Modulation der Keratinozytendifferenzierung und die Barrierefunktion der Haut zu spielen [FUCHS 1990] [NOSE et al. 1990] [SEGUELA et al. 1993]. Die $\alpha 9$ -Untereinheit findet man hauptsächlich in basalen Zellen der Epidermis [KURZEN et al. 2004] [ARREDONDO et al. 2002] [GRANDO et al. 1995a]. Durch Aktivierung dieser nAChR werden die Mitose und die Zelldifferenzierung gefördert [GRANDO 1997] [NGUYEN et al. 2001].

Die Verteilung der mAChR in der Haut erscheint weniger komplex und variabel als die der nAChR. Die Keratinozyten können alle Subtypen der muskarinischen Rezeptoren (mAChR1-5) exprimieren, wobei M1- und M4-mAChR1 auf suprabasale Keratinozyten begrenzt ist, während M2-, M3-, und M5-mAChR vorwiegend in basalen Zellen zu finden ist. Eine Aktivierung der mAChR kann in der Zelle Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit, die Apoptose, die Zell-Zell-Kontakte und die Proliferation haben [GRANDO et al. 1995b] [NGUYEN et al. 2001].

In in vitro Versuchen konnte man feststellen, dass cholinerge Medikamente Einfluss auf die Proliferation, die Adhäsion, die Migration und die Differenzierung der Keratinozyten haben. Auch wird der Freisetzung von non-neuronalem ACh eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von spezifischer und unspezifischer Abwehr zugesprochen [WESSLER et al. 1999].

Neben den klassischen ACh-Rezeptoren wird für die Keratinozyten der Haut Pem-

phaxin, ein Annexin-ähnlicher Rezeptor beschrieben [NGUYEN et al. 2000]. Die Bindung von ACh an Pemphaxin begünstigt die Zellmotilität und die Zelladhäsion [GRANDO 1997] und verhindert außerdem akantholytische Prozesse [NGUYEN et al. 2000].

Aus epidemiologischen Studien weiß man, dass chronischer Nikotinabusus zu einer verfrühten Hautalterung [AIZEN und GILHAR 2001] [ERNSTER et al. 1995] [FRANCES 1998] und zu verzögerter und abnormer Wundheilung [FRICK und SEALS 1994] [KWIATKOWSKI et al. 1996] [SILVERSTEIN 1992] führt. Sowohl die Hautalterung als auch die Wundheilung wird von den dermalen Fibroblasten (DF) reguliert [GRINNELL 1994] [YIN et al. 2000] [YIN et al. 2001]. Nikotinexposition führt hauptsächlich durch die $\alpha 3$ -Untereinheit [ARREDONDO et al. 2003] zur Verringerung der Proliferation von DF sowie zur Steigerung ihrer Kollagenaseproduktion. Daraus resultiert eine Abnahme des dermalen Kollagengerüsts [STUBBS et al. 2000]. Es ist jedoch nicht nur die Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit, sondern auch die von $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ und $\beta 4$ verändert, was zu einer Änderung der Bindungskinetik der nAChR führt. Dies könnte zu einer Nikotin-bedingten Veränderung des genetischen Programms für Wachstum und Remodeling-Funktionen der DF führen [ARREDONDO et al. 2003].

1.3. Die Atopische Dermatitis (AD)

Die atopische Dermatitis (AD, syn.: Neurodermitis) ist eine chronische oder chronisch rezidivierende, entzündliche Hautkrankheit multifaktorieller Genese [BÜCHNER 2001]. Ursächlich werden genetische, immunologische und psychische Faktoren gesehen. Zusammen mit der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale bildet sie den Formenkreis der atopischen Erkrankungen [NOVAK und BIEBER 2004].

Durch den dramatischen Anstieg der Inzidenz der AD besonders in der Bevöl-

Rezeptor	M1	M2	M3	M4	M5	$\alpha 3$	$\alpha 5$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 4$
Epidermis													
BCL	-	(+)	+	-	+	+	+/-	+	++	+	-	+/-	+
SPL	+	-	+	+	+	-	-	-	+m	(+)	-	-	-
GRL	+	-	-	+	-	+/-cp	+/-cp	+m	-	+	+m	+/-cp	+/-cp
Haarfollikel													
ORS													
-BCL	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+b	+
-CCL	(+)	-	(+)	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-
-CL	-	+	-	+	-	-	(+)	+	-	+	+	+	-
IRS	-	+	+	+	(+)	+	+	-	-	+	+	+Hu	(+)
TC	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Matrix	-	-	+	+	(+)	?	+	-	+	-	-	-	-
Talgdrüsen													
basal	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	-	+	+
suprabasal	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Ductus	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Schweißdrüsen													
Myo	(+)	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	-	+	+
Epithel	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Ductus	(+)	-	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	+	+

Tabelle 1.2.: Expression der Acetylcholinrezeptoren (AChR) in gesunder humaner Haut von Nichtrauchern

Legende: BCL, basale Zellschicht; CCL, innere Zellschicht; CL, angrenzende Zellschichten; CP, cytoplasmatisches Staining einer einzelnen Zellschicht; GRL, Stratum granulosum; IRS, innere Wurzelscheide; M, Membranstaining; Myo, Myoepithelzellen; ORS, äußere Wurzelscheide; SPL, Stratum spinosum; TC, Haarzellen; +, persistierende Expression; +/-, variable Expression; (+), schwache Expression; -, keine Expression; AChR, Acetylcholinrezeptor.

(modifiziert nach [KURZEN 2004])

kerung der westlichen Welt hat sie in den letzten Jahren an Bedeutung für die Medizin gewonnen [NOVAK und BIEBER 2004].

1.3.1. Krankheitsbild und Morphe

In der Klinik zeigt die AD häufig ein klassisches Bild: Die von heftigem Juckreiz begleiteten Ekzeme beginnen oft bereits in früher Kindheit und zeigen eine alters-typische Verteilung am Körper. Zusätzlich treten sogenannte Atopie-Stigmata,

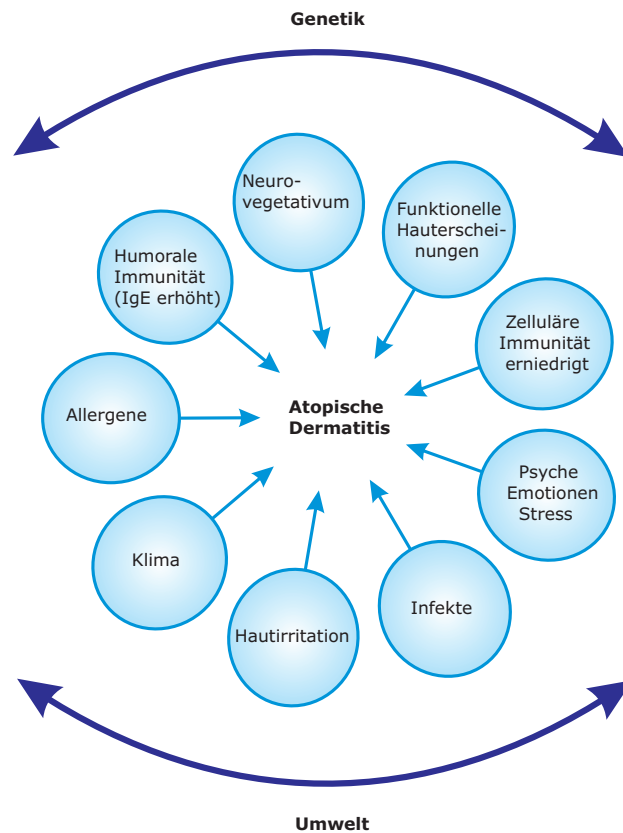


Abbildung 1.5.: Schema zur multifaktoriellen Genese der atopischen Dermatitis. [JUNG und MOLL 2003]

wie die doppelte Lidfalte nach Dennie-Morgan, der weiße Dermographismus und das Hertoghe-Zeichen (Ausdünnung der seitlichen Augenbrauenregion) häufiger auf (s.a. Minor-Kriterien in Tab. 1.3, S.23) [SCHÄFER 2000].

Beginnt die AD im Säuglingsalter, so findet man meist Milchschorf, der den Kopf und das Gesicht befällt, als erste Manifestation (s. Abb. 1.6, S.24). Ekzematöse Veränderungen zeigen sich bei Säuglingen und Kleinkindern ebenfalls im Bereich von Kopf und Hals. Im weiteren Verlauf breiten sich die Hautveränderungen dann auf den Rumpf und die Streckseiten der Extremitäten aus. Durch ständiges Kratzen finden sich gerade bei kleinen Kindern häufig Superinfektionen der ekzematösen Hautareale [NOVAK und BIEBER 2004].

Ab dem Schulkindalter findet man die klassischen Beugenekzeme an Knie- und

Major Kriterien	Minor Kriterien
Pruritus	Xerosis
typische Morphologie und Verteilung	pos. Hauttest (Prick-Test, etc.)
chronisch oder chronisch rezidivierender Verlauf	erhöhtes Serum-IgE
positive Eigen- oder Familienanamnese für Atopien	Neigung zu Superinfektionen
	palmar Hyperlinearität
	chronisches Fußekzem
	chronisches Handekzem
	Hertoghe-Zeichen
	Dennie-Morgan-Falte
	Mamillenekzem
	Cheilitis
	Pityriasis alba
	Nahrungsmittelintoleranz
	Wollunverträglichkeit
	Juckreiz beim Schwitzen
	weißer Dermographismus

Tabelle 1.3.: Diagnosekriterien der atopischen Dermatitis nach Hanifin und Rajka: eine positive Diagnose wird gestellt, wenn mindestens drei der Major Kriterien und drei der Minor Kriterien erfüllt sind.

Ellenbeuge sowie am Handgelenk (s. Abb. 1.7, S.25).

Die AD verschwindet häufig in der Pubertät, sie kann jedoch auch persistieren oder sich sogar erst im Erwachsenenalter entwickeln. Im Falle einer Spätmanifestation zeigen sich oft Ekzeme an Nacken, Kopf und Händen.

Die Diagnose der AD wird hauptsächlich auf der Basis der Klinik und der Anamnese gestellt. Laborchemische und invasive Diagnostik spielen nur eine untergeordnete Rolle. Unterstützend zur klinischen Diagnostik werden laborchemisch der IgE-Wert (Immunglobulin E), unterschiedliche Allergietests und der Atopie-Patch-Test angewandt [NOVAK und BIEBER 2004].

1.3.2. Extrinsische und intrinsische Form der AD

Lange wurde davon ausgegangen, dass Sensibilisierung und Allergien essenzielle Bestandteile der AD seien. Seit den 80er Jahren ist jedoch bekannt, dass bei



Abbildung 1.6.: Atopische Dermatitis bei einem Säugling: er weist die charakteristischen Zeichen Milchschorf und Gesichtserythem der Säuglings-AD auf.

20-30 % der Patienten weder Sensibilisierungen auf Nahrungsmittel- noch auf Aeroallergene bestehen und das spezifische IgE nicht erhöht ist [WÜTHRICH et al. 1983] [WÜTHRICH 1984] [WÜTHRICH 1989]. Diese Form der AD wird als intrinsischer Typ bezeichnet. Bei Patienten mit extrinsischem Typ findet man dagegen IgE-Erhöhen und Sensibilisierung gegen Nahrungsmittel- und Aeroallergene. Davon lässt sich der gemischte Typ der AD abgrenzen. Er ist obligat mit einem hyperreagiblen Bronchialsystem und erhöhten IgE-Werten assoziiert [BÜCHNER 2001].

1.3.3. Epidemiologie

In den vergangenen 40 Jahren hat die Inzidenz der AD besonders in der westlichen Welt dramatisch zugenommen. Hier leiden heute mehr als 10 % der Kinder an AD [LEUNG 2000].



Abbildung 1.7.: Das Beugenekezem als charakteristische Manifestation der AD im Jugend- und Erwachsenenalter.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass das Risiko an AD zu erkranken sich verdoppelt, wenn ein Elternteil an AD erkrankt ist, und sich verdreifacht, wenn beide Eltern an AD leiden [ABERG 1993] [SCHAFER et al. 1999]. Daraus lässt sich ein hoher Stellenwert genetischer Prädisposition für die AD ableiten. Die Hygiene-Hypothese ist ein favorisierter Ansatz, um die rapide steigende Inzidenz der AD zu erklären. Sie besagt, dass der hohe Lebensstandard und die hygienischen Verhältnisse in den Industriestaaten sowie der steigende Einsatz von Antibiotika für diesen Anstieg verantwortlich seien [WILLS-KARP et al. 2001]. Sie zielt damit darauf ab, dass der verminderte Kontakt des angeborenen Immunsystems mit bakteriellen und viralen Bestandteile die gesunde Entwicklung der zellulären Immunabwehr behindert und dadurch das Gleichgewicht zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem gestört wird (s. Kap. 1.3.4, S.26) [KALLIOMAKI et al. 2001] [KALLIOMAKI et al. 2003].

Das Stillen von Risikokindern ist in den letzten Jahren immer wieder kontrovers

diskutiert worden, da sowohl positive als auch negative Effekte aufgezeigt werden konnten [GDALEVICH et al. 2001] [SCHOETZAU et al. 2002] [WILLS-KARP et al. 2001]. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass das Stillen von Kindern, deren Eltern an atopischen Erkrankungen leiden, eine vorwiegend protektive Wirkung zeigt. Eine Stillzeit von sechs Monaten wird daher empfohlen. Vermutlich führen unter anderem Toleranz fördernde Zytokine, die in großen Mengen in der Muttermilch vorhanden sind, über die Produktion von IgA zu einem protektiven Einfluss [KALLIOMAKI et al. 1999].

Weiterhin wurde festgestellt, dass sowohl Nahrungsmittelallergene als auch Aeroallergene zu einer Verschlimmerung der AD führen können. Nach diagnostischer Sicherung solcher Triggerfaktoren sollte der Allergenkontakt möglichst vermieden werden [BÜCHNER 2001].

1.3.4. Immunologie

Bei Patienten mit AD ist die Hautbarrierefunktion nachhaltig gestört. Dies resultiert aus einer veränderten Zusammensetzung von Ceramiden und Matrixproteinen. Nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um eine sekundäre Reaktion auf die lokale Entzündung handelt oder um einen intrinsischen Defekt der Keratinozyten [FARTASCH 1997] [HÖGER 2005].

Infolge der defekten Barrierefunktion kommt es zu Hauttrockenheit (Xerosis), erhöhtem transepidermalem Wasserverlust und einer Verschiebung des pH-Wertes der Haut in den alkalischen Bereich. Die Keratinozyten schütten vermehrt proinflammatorische Zytokine aus, die zur Aktivierung von dendritischen Zellen (DZ) in der Haut und dadurch zur Rekrutierung von Entzündungszellen, z.B. T-Zellen, führen [PASTORE et al. 1997] [GIROLOMONI und PASTORE 2001] [SOUMELIS et al. 2002].

Die DZ gelten als Bindeglied zwischen der IgE-vermittelten und der zellulären

Entzündungsreaktion. Sie tragen auf ihrer Oberfläche einen hochaffinen IgE-Rezeptor $Fc_\epsilon R1$, der zirkulierendes IgE bindet. Dieser Rezeptor wird nur auf DZ in der Haut von AD-Patienten in größeren Mengen exprimiert. Es wird vermutet, dass die durch die gestörte Hautbarriere eindringenden Allergene von den IgE-tragenden DZ aufgenommen werden und nach der Antigenprozessierung spezifischen T-Zellen präsentiert werden [LEUNG 2000].

Der Ablauf der Entzündungsreaktion wird durch das für die AD typische Ungleichgewicht zwischen den T-Helfer-1- (TH-1) und den T-Helfer-2-Zellen (TH-2) beeinflusst. Die TH-1-Zellen produzieren vorzugsweise Zytokine zur Stimulation von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen sowie zur Induktion der IgG-Bildung. Diese Eigenschaften erlauben die Bekämpfung infektiöser Krankheitserreger. Die von den TH-2-Zellen produzierten Zytokine haben vor allem pro-allergische Wirkung. Dies führt über die humoral vermittelte IgE-Produktion zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen [BRAUN et al. 2001]. Das Gleichgewicht zwischen TH-1- und TH-2-Zellen bei AD-Patienten verschiebt sich in den ersten 24 Stunden nach Allergenkontakt zugunsten der TH-2-Zellen. Es kommt zur Ausschüttung von Interleukin-4 (IL-4), IL-5 und IL-13, und die Zahl der IgE-beladenen DZ nimmt zu. Nach 48-72 Stunden kommt es zur Umwandlung in eine Immunantwort vom TH-1-Typ, die von interferonproduzierenden T-Zellen dominiert wird. Über Fas-Liganden bewirken die T-Zellen die Apoptose der Keratinozyten. Die Fas-Liganden sind membranständige Cytokine, die den Tumornekrosefaktoren (TNF) zugerechnet werden. Durch Kontakt mit dem Fas-Rezeptor auf der Oberfläche der Keratinozyten wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Hierbei erfolgt zunächst der Verlust wichtiger Zelladhäsionsmoleküle. Die einzelnen Keratinozyten lösen sich aus dem Zellverband und gehen unter Freisetzung von Autoallergenen zugrunde [NOVAK und BIEBER 2004].

Erkrankung	Veränderung im cholinergen System
Mal de Meleda	Blockierung der SLURP-1 vermittelten Aktivierung des $\alpha 7$ -nAChR
Psoriasis	Funktionsverlust der SLURP-2 vermittelten Feinregulation des cholinergen Systems der Haut
Atopische Dermatitis	erhöhte Konzentrationen von ACh in der Epidermis und den oberen Bereichen der Dermis
Vitiligo	Reduktion von AChE-Konzentration in der Depigmentierungsphase und Normalisierung während der Repigmentierungsphase
Pemphigus vulgaris	Autoantikörper u.a. gegen AChR bewirken einen Verlust der Regulation von Zelladhäsion und Zellform

Tabelle 1.4.: Veränderungen des cholinergen Systems der Haut im Zusammenhang mit dermatologischen Erkrankungen: die Tabelle gibt Veränderungen des cholinergen Systems der Haut wieder, für die bekannt ist, dass sie im Zusammenhang mit dermatologischen Erkrankungen auftreten [GRANDO et al. 2006]. (SLURP, secreted mammalianLy6/uPAR-related protein)

1.3.5. Acetylcholin und atopische Dermatitis

Wie in Kapitel 1.2.3 (s.S.19) beschrieben, findet man in der Haut ein ausgeprägtes cholinerges System. In den letzten Jahrzehnten haben Forschungsarbeiten immer wieder ergeben, dass dem cholinergen System eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie verschiedener dermatologischer Erkrankungen zukommt (s. Tab. 1.4, S.28). Bereits in den 60er Jahren wurde dem cholinergen System eine Rolle in der Pathophysiologie der AD zugesprochen, da in Hautbiopsien von Patienten mit AD erhöhte ACh-Werte gefunden wurden [SCOTT 1962]. Weitere Versuche ergaben, dass die Reaktion auf ACh in der Haut von AD-Patienten verändert ist. Während die Injektion von ACh in die Haut von AD-Patienten einen starken Juckreiz auslöst, führt dies bei gesunden Probanden sowie bei non-läsionaler Haut von AD-Patienten zu schmerzhaften Sensationen [HEYER et al. 1997].

Ein weiterer Zusammenhang zwischen AD und dem cholinergen System scheint sich aus der klinisch gut bekannten Verschlechterung der Symptome durch schweißtreibende Tätigkeiten zu ergeben. Da die Schweißdrüsen cholinerg innerviert werden, kommt es beim Schwitzen zur vermehrten Ausschüttung neuronalen AChs [ERNSBERGER und ROHRER 1999], wodurch der Juckreiz in der läsionalen Haut von AD-Patienten verstärkt werden könnte.

Über die Hintergründe der pathophysiologischen Zusammenhänge von AD und dem cholinergen System der Haut ist jedoch insgesamt noch wenig bekannt.

1.4. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen geprüft:

- Die Expression verschiedener α -Untereinheiten neuronaler nAChR unterscheidet sich in non-läsionalen und läsionalen Hautarealen von AD-Patienten.
- Die mRNA-Expression verschiedener α -Untereinheiten neuronaler nAChR unterscheidet sich in non-läsionalen und läsionalen Hautarealen von AD-Patienten im Vergleich zu hautgesunden Probanden.
- Die Lokalisation der Proteine verschiedener α -Untereinheiten neuronaler nAChR unterscheidet sich in non-läsionalen und läsionalen Hautarealen von AD-Patienten im Vergleich zu hautgesunden Probanden.

Methodischer Ansatz:

- Die Unterschiede lassen sich sowohl auf transkriptionaler (quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR)), als auch auf translationaler Ebene (Immunhistochemie) nachweisen.

Kapitel 2.

Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden 20 Probanden mit AD und 17 gesunde, nicht an atopischen Erkrankungen leidende Probanden untersucht. Als Einschlusskriterien waren zum Beginn der Studie folgende Merkmale festgelegt worden:

2.1.1. Einschlusskriterien für AD-Patienten

Die medizinische Diagnose der AD musste gesichert sein. Diese wurde nach den international anerkannten Kriterien von Hanifin und Rajka [RAJKA 1986] (s. Tab. 1.3, S.23) gestellt. Eine positive Diagnose konnte gestellt werden, wenn mindestens 3 der 5 Majorkriterien und 3 von 16 Minorkriterien erfüllt waren. Außerdem mußte die AD bereits länger als ein Jahr bestehen.

Das Alter der Probanden sollte mindestens 18 und höchstens 50 Jahre betragen. Zur Ermittlung dieser Faktoren wurde ein Fragebogen konzipiert, der zusätzlich Informationen über Geschlecht, Familienstand, Beruf, Zigarettenkonsum, andere

$$(2.1) \quad \frac{A}{5} + \frac{7B}{2} + C$$

SCORAD-Formel

A=Flächenbefall nach „Neunerregel“

B=(Rötung, Ödem/Papelbildung, Nässen, Exkoration, Lichenifikation, Trockenheit)

C=Juckreiz und Schlaflosigkeit auf einer Skala von 1-10

atopische Erkrankungen, Ausbreitung und Behandlung der AD, Belastung durch die Erkrankung, Familienanamnese und die Stressempfindlichkeit im Hinblick auf den Krankheitsverlauf enthielt (s. A.1 im Anhang 1, S.98). Außer den Kriterien nach Hanifin und Rajka konnte aus dem Fragebogen auch der SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis, European Task Force on Atopic Dermatitis 1993) [GELMETTI und COLONNA 2004] [PUCCI et al. 2005] errechnet werden. Er ist ein Maß für den Schweregrad der AD und errechnet sich nach der SCORAD-Formel (s.o.). Aus den Daten ließ sich dann in Verbindung mit den Blutwerten für IgE, Inhalationsallergene und Nahrungsmittelallergene der AD-Typ bestimmen. Durch die Auswertung der Verschlechterung der AD auf Stress konnte man die Patienten in Low-Stress- und High-Stress-Responder unterteilen (zur Auswertung des Fragebogens s. Auswertungsteil von A.1 im Anhang 1, S.98)

2.1.2. Atopie-negative Probanden

Die Atopie-negativen Probanden wurden mit den AD-Probanden nach Alter und Geschlecht parallelisiert.

2.1.3. Ausschlusskriterien

Nicht in die Studie aufgenommen wurden solche AD- oder hautgesunde Probanden, die eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufwiesen:

- Superinfiziertes Ekzem oder Herpes simplex an der Entnahmestelle
- Manifestes Asthma bronchiale oder Rhinitis allergica
- Diagnose einer schwerwiegenden psychischen Erkrankung (z.B. schizoaffektive Psychose, ICD 10-Verschlüsselung: F 0, 1, 2, 7, 8, 9)
- Diagnose einer schweren körperlichen Erkrankung (z.B. Krebserkrankungen, Morbus Crohn, Essstörungen)
- Einnahme von Medikamenten, die nachweislich das Immunsystem beeinflussen (z.B. Glukokortikosteroide, β -Adrenergika, Antihistaminika, Psychopharmaka, Cyclosporin A).

2.2. Probengewinnung

Den AD-Patienten wurden jeweils zwei Hautbiopsien mit einer 4 mm Stanze entnommen. Als Entnahmestelle wurden ein von AD befallener und ein nicht befallener Bereich der Haut ausgewählt. Nach Möglichkeit wurde die Stanze *ex loco typico*, wie etwa aus der Ellen- oder Kniebeuge entnommen. Bei den hautgesunden Probanden wurde lediglich eine Hautbiopsie durchgeführt deren Lokalisation möglichst der des zugehörigen AD-Probanden aus läsionaler Haut entsprach.

Vor der Entnahme der Biopsie wurde eine lokale Infiltrationsanästhesie mit Lidocain durchgeführt. Im Anschluss an die Biopsie wurde die Wunde mittels Nahtmaterial (z.B. Ethicon Prolene 3/0) verschlossen. Die Fäden wurden nach 7-10 Tagen (je nach Entnahmestelle) entfernt. Die Hautbiopsien wurden jeweils in zwei Teile geteilt, wobei ein Teil für die RT-PCR in einem Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und der andere Teil auf einem Stück Filterpapier in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet wurde. Das Filterpapier mit der eingebetteten Hautbiopsie wurde gewebeschonend in gekühl-

tem Isopentan schockgefroren. Beide Proben wurden dann bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Serumkonzentration von IgE (gesamt), sx1 (inhalationsallergenspezifische IgE-Antikörper) und fx1 (nahrungsmittelallergenspezifische IgE-Antikörper) wurde sowohl den AD- als auch den hautgesunden Probanden jeweils ein Serumröhrchen Blut abgenommen.

2.3. Allgemeine Analyseverfahren

2.3.1. Histologische Begutachtung

Um die histologische Diagnose einer AD zu stellen, wurden von jedem Probanden sowohl von läsionaler als auch von non-läsionaler Haut Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) angefertigt.

Anfertigung der Schnitte:

Das unfixierte schockgefrorene Gewebe wurde zunächst am Kryostat (Cryo-Star HM 560, Microm) bei -21°C geschnitten. Die Schnittdicke betrug $10\text{ }\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden anschließend mit SuperFrost Plus Objektträgern (R. Langenbrinck, Emmendingen) vom Kryostatmesser abgenommen und für 20 min. bei -20°C mit Aceton fixiert.

Anschließend wurden sie für 4,5 Min. in Hämatoxylin und zum "Bläuen" für 10 Minuten in lauwarmes Wasser gehalten. Dann wurde mit 0,1% wässrigem Eosin gegengefärbt, bevor die überflüssigen Farbpigmente dann mit einer Alkohol-Reihe mit Ethanol in aufsteigender Konzentration herausgewaschen wurden. Zuletzt wurden die Schnitte in Xylol überführt und in Eukitt (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) eingedeckelt.

Die HE-Schnitte wurden einem dermatologischen Histopathologen zur Begutachtung vorgelegt. Zur Beurteilung wurden die für die AD typischen Veränderungen

Spongiose, Parakeratose, Hyperkeratose, Acantholyse und perivaskuläre Leukozyten in Epidermis und Dermis herangezogen.

2.3.2. Direkte und indirekte Immunhistochemie

Indirekte Immunhistochemie:

Die Hautschnitte wurden wie unter 2.3.1 (s.S.33) beschrieben vorbereitet und anschließend für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Immunhistochemie mussten zunächst die unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe mit Hilfe einer Blocklösung abgesättigt werden (s. Tab. 2.1, S.35) [BERGER et al. 1986]. Nach Aufbringen der Blocklösung wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Blocklösung mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Primärantikörper in der ausgetesteten Verdünnung (s. Tab. 2.2, S.35) aufgetragen. Zur Verdünnung der primären Antikörper wurde PBS/NaCl (phosphatgepufferte Elektrolytlösung in doppelter Salzkonzentration) verwendet um die Hintergrundreaktionen zu verringern [GRUBE und WEBER 1980]. Über Nacht wurden die Schnitte dann in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Antikörper mit der Vakuumpumpe abgesaugt und die Schnitte zwei mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden die Sekundärantikörper (s. Tab. 2.3, S.36), die ebenfalls mit PBS/NaCl auf die benötigte Konzentration verdünnt worden waren, auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit für die Sekundärantikörper betrug eine Stunde unter Lichtschutz bei Raumtemperatur. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte drei mal für fünf Minuten gewaschen und dann für 20 Minuten in PFA 4% (Paraformaldehyd), ebenfalls unter Lichtschutz, nachfixiert. Danach wurden die Schnitte noch zwei mal fünf Minuten in PBS und einmal für zwei Minuten in

Aqua dest. gewaschen und dann in Carbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingebettet. Die fertigen Schnitte wurden bei +4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
PBS (Phosphate Buffered Saline)	pH 7,4 28,75 ml Lösung A (0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2[\text{H}_2\text{O}]$) 96,20 ml Lösung B (0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2[\text{H}_2\text{O}]$) 22,4 g NaCl Aqua dest. ad 5 Liter auffüllen
PBS/NaCl gepuffertes Glycerol	PBS mit doppelter Salzkonzentration pH 8,6 159 g/l Lösung A (1,5 M Na_2CO_3) 126 g/l Lösung B (1,5 M NaHCO_3) Lösung C Glycerol, wasserfrei 1 Teil Puffer + 1 Teil Glycerol
PFA 4%	40g/l Paraformaldehyd 500 ml Aqua dest. 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer
Blocklösung	0,5% Tween 20 0,1M Bovines Serum Albumin (BSA) 10M Normales Schweine Serum (NSS)

Tabelle 2.1.: Verwendete Lösungen und Puffer

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
$\alpha 3$ -nAChR	Meerschweinchen	1:2000	H.Kurzen, Mannheim, Deutschland
$\alpha 5$ -nAChR	Meerschweinchen	1:2000	H.Kurzen, Mannheim, Deutschland
$\alpha 7$ -nAChR	Meerschweinchen	1:2000	H.Kurzen, Mannheim, Deutschland
$\alpha 7$ -nAChR	Maus	1:1600	Sigma, Steinheim, Deutschland
$\alpha 9$ -nAChR	Meerschweinchen	1:1000	H.Kurzen, Mannheim, Deutschland
$\alpha 9$ -nAChR	Kaninchen	1:400	S.Grando, Minnesota, USA
$\alpha 10$ -nAChR	Kaninchen	1:2000	W.Kummer, Giessen, Deutschland
Synaptophysin	Maus, monoklonal	1:400	Dako, Hamburg, Deutschland
Neurofilament 68	Maus, monoklonal	1:300	Sigma, Steinheim, Deutschland
α -smooth-muscle-actin	Maus, monoklonal	1:500	Sigma, Steinheim, Deutschland
CD1a	Maus, monoklonal	1:500	BD Phar Mingen
CD31, Mec 13.3	Maus, monoklonal	1:100	BD Phar Mingen
Caveolin 2	Maus, monoklonal	1:400	BD Transduction Laboratories
NADPH-Oxidase	Maus, monoklonal Klon 54.1	1:2000	J.Burrit, Montana, USA
Fibroblast Surface Protein	Maus, monoklonal Klon 1B10	1:100	Sigma, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.2.: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Konjugat	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-IgG	FITC	Esel	1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Kaninchen-IgG	FITC	Ziege	1:400	Cappel, Eschwege, Deutschland
anti-Maus-IgG	Cy 3	Esel	1:1000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Kaninchen-IgG II	Cy 3	Esel	1:2000	Chemicon, Temecula, USA
anti-Meerschweinchen-IgG	Cy 3	Esel	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.3.: Verwendete Sekundärantikörper**Direkte Immunhistochemie:**

Anders als bei der indirekten Immunhistochemie waren hier die primären Antikörper schon an ein Fluorochrom gekoppelt (z.B. bei α -smooth-muscle-actin), wodurch die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfiel. Die Schnitte wurden daher direkt nach der Inkubation mit dem Primärantikörper dreimal mit PBS gewaschen und dann, wie oben beschrieben, mit PFA nachfixiert und in gepuffertem Glycerol eingebettet.

Doppelimmunhistochemie:

Dieses Verfahren glich dem der direkten Immunhistochemie. Es wurden aber zwei (oder mehr) Primärantikörper gleichzeitig auf den Schnitt aufgebracht. Um die Fluoreszenzen der verschiedenen Antikörper unterscheiden zu können, verwandt man Sekundärantikörper mit verschiedenen Fluorochromen.

Toluidin Blau-Färbung:

An den Hautschnitten wurden zunächst mittels indirekter Immunhistochemie die Untereinheiten $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ und $\alpha 10$ nachgewiesen. Mastzellen wurden bildlich festgehalten. Anschließend wurden die Objektträger in PBS gewaschen und dann für 45 Sekunden mit 0,1 % Toluidinblau gefärbt. Sie wurden dann noch einmal kurz in PBS gewaschen, in PBS eingedeckelt und unter dem Mikroskop auf Mastzellen überprüft.

Mikroskopische Auswertung:

Die mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (BX60, Olympus, Hamburg) und konfokalem Laserscanning-Mikroskop (CLSM, TCS SP2, Leica, Bensheim). Im Fluoreszenzmikroskop wird das Licht durch einen Sperrfilter geleitet, der nur diejenige Wellenlänge durchlässt, die das Fluorochrom des benutzten Sekundärantikörpers zur Lichtemission anregt (s. Tab. 2.4, S.37).

Das CLSM visualisiert die Verteilung der Fluoreszenz in den verschiedenen Ebenen des Präparats. Das Präparat wird dabei mit einem hoch fokussierten Laser, der als Exzitationsquelle dient, gescannt und die emittierten Fluoreszenzen werden zu einem optischen Bild zusammengefügt (s. Abb. 2.1, S.38). Im Gegensatz zu den normalen Fluoreszenzmikroskopen muss die emittierte Fluoreszenz eine Enge (Pin-hole) im optischen System passieren, wodurch nur Fluoreszenz, die von einer bestimmten Ebene des Präparats ausgeht, den Lichtdetektor erreicht. Durch die Aufnahme von Bildern aus den verschiedenen Ebenen des Präparats - also durch Veränderung der Entfernung zwischen Präparat und Objektiv - kann ein 3D-Bild der Verteilung der Fluoreszenzen rekonstruiert werden.

Filter	Fluorochrom	Erregerfilter	Dichroischer Spiegel	Sperrfilter
MBA	FITC	460-490 nm	455 nm	515-50 nm
WIY	Cy 3	BP 454-580 nm	600 nm	610 nm
	UV-Filter	400-410 nm	455 nm	455nm

Tabelle 2.4.: Verwendete Filter

2.3.3. RT-PCR

Bei der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) handelt es sich um eine in vitro-Technik zur gezielten Vervielfältigung definierter Desoxyribonucleinsäure-(DNA)-Abschnitte. Zunächst muss der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen denaturiert werden, wodurch zwei DNA-Einzelstränge entstehen (Schmelzen). Die Sequenzen

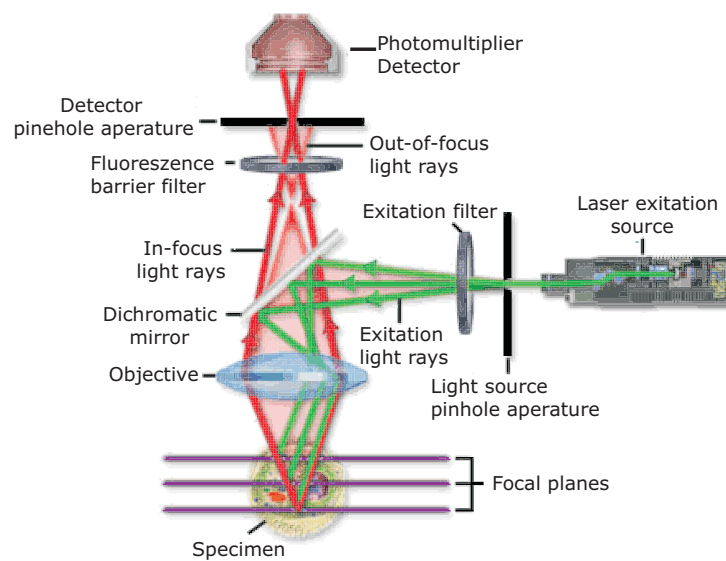


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Aufbaus des Laserscanning-Mikroskops [OLYMPUS 2005]

vor und hinter dem zu replizierenden DNA-Abschnitt müssen bekannt sein. Mit Hilfe eines Oligonucleotidprimers, eines einzelsträngigen DNA-Moleküls, das komplementär zum Ende der definierten Sequenz der DNA-Matrize ist, wird die PCR gestartet. Dazu muss die Reaktion wieder abgekühlt werden, damit die Primer spezifisch an die Zielregion binden können (annealing). Bestehen die richtigen Bedingungen (Puffer, Temperatur, etc.), so kann eine *Thermophilus aquarius* (Taq)-Polymerase in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) nun den Primer entlang der denaturierten einzelsträngigen DNA-Matrize verlängern. Bei *Thermophilus aquarius* handelt es sich um ein Bakterium, welches man in heißen Quellen und Geysieren gefunden hat und dessen hitzestabile DNA-Polymerase auch nach dem Erhitzen noch arbeiten kann. Der neu synthetisierte DNA-Strang ist damit komplementär zu der DNA-Matrize. Die Anzahl der neu synthetisierten DNA-Stränge verdoppelt sich mit jedem Zyklus, wodurch die Menge des DNA-Produkts exponentiell zunimmt.

Um Botenribonucleinsäure (mRNA) herzustellen muss die mRNA zunächst mit-

tels mRNA-spezifischer Primer (oligo-dT) und der reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgewandelt werden. Auf diese Weise kann die Genexpression auf der Stufe der RNA analysiert werden.

Um eine RT-PCR an humaner Haut durchzuführen, mussten die Proben zunächst in Lysis-Puffer (Qiagen, Heiden, Deutschland) überführt und anschließend mit Hilfe eines Gewebezerkleinerers, einer sogenannten Mixer Mill (MM200, Retsch, Haan, Deutschland) bei einer Frequenz von 300 Hz homogenisiert werden. Die gesamte RNA wurde dann gemäß dem Protokoll des Herstellers (RNeasy kit, Qiagen) über Säulen isoliert. Die vorhandene Kontamination mit DNA wurde durch DNase (1U/ μ g Gesamt-RNA, Gibco-BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) unter Beigabe von 20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 2 mMol $MgCl_2$ und 50 mMol KCl für 15 min bei 25°C eliminiert. Gleiche Mengen RNA wurden bei 42°C für 50 min revers transkribiert. Dazu wurden sie mit 3 mMol $MgCl_2$, 75 mMol KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM Dithiothreitol, 0,5 mM dNTPs (Gibco-BRL) und 25 oligo-dT (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) sowie 200 U Superscript RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Gibco-BRL) versetzt. Aliquots der entstandenen cDNA wurden nachfolgend zur PCR eingesetzt. Für die PCR-Reaktion wurden der Puffer II mit 2 mM $MgCl_2$, 0,25 mMol dNTP, 0,5 U/25 μ l AmpliTaq Gold Polymerase (alle Reagenzien von Perkin Elmer) und 20 μ Mol von jedem Primer (s. Tab. 2.5, S.40, MWG Biotech) gemischt. Die Sequenzen der spezifischen Primer der nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2$ -MG), β -actin und 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA) (s. Tab. 2.5, S.40) wurden mittels Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) ermittelt. Die Einstellungen des Cyclers waren: 10 min bei 95°C, 40 Zyklen von jeweils 30 sek bei 94°C, 20 sek bei 62°C und 30 sek bei 73°C, gefolgt von 7 min bei 73°C. Die Identifizierung der RT-PCR-Produkte erfolgte durch Analyse im Ethydiumbromid-Gel sowie durch Sequenzierung (MWG Biotech).

nAChR-Untereinheit (Accession Nr.)	Primer-Paare	Produktlänge
$\alpha 3$ (M37981)	fw: CAGAGTCCAAAGGCTGCAAG rev: AGAGAGGGACAGCACAGCAT	148
$\alpha 4$ (L35901)	fw: CTCACCGTCCTTCTGTGTC rev: CTGGCTTTCTCAGCTTCCAG	110
$\alpha 5$ (NM000745)	fw: CTTACACGCTTCCCAAACCT rev: CTTCAACAACCTCACGGAACA	186
$\alpha 7$ (U40583)	fw: GTACGCTGGTTTCCCTTTGA rev: CCACTAGGTCCCATTCTC	138
$\alpha 9$ (NM017581)	fw: GAAAGCAGCCAGGAACAAAG rev: GCACTTGGCGATGTACTCAA	156
$\alpha 10$ (AF199235)	fw: ACACAAGTGCCCTGAAGACCT rev: TCCCATCGTAGGTAGGCATC	159
$\beta 2$ -MG	fw: GCTTTTCATCCATCCGACATTG rev: GTTCACACGGCAGGCATACTC	164
β -Actin	fw: CTCCATCATGAAGTGTGACGTGG rev: GAGTACTTGGCTCAGGAGGA	174
18S-rRNA (Classic II, 1717)	Ambion, Austin, USA	324

Tabelle 2.5.: Primerpaare für nAChR-Untereinheiten und House-keeping Gene

Quantitative RT-PCR:

Durch die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurden die Mengen der nAChR $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten mRNA in Relation zum House-keeping Gen ermittelt. Es wurde die läsionale und die non-läsionale Haut von AD- sowie von hautgesunden Probanden untersucht. Die Präparation wurde wie für die RT-PCR beschrieben durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden laut den Angaben des Herstellers des benutzten Ready-to-use Kits vorbereitet (SYBR green, QuantiTect, Qiagen). Spezifische Primer für $\beta 2$ -MG, β -actin und 18S rRNA wurden als House-keeping Gen verwendet. Die Daten wurden gegenüber den House-keeping Genen ($\beta 2$ -MG, β -actin und 18S rRNA) normalisiert. Die normalisierten Ergebnisse wurden als ΔCT -Werte bezeichnet. Um die Ergebnisse der Biopsien von läsionaler und non-läsionaler Haut zueinander in Bezug zu setzen, wurde die relative mRNA-Expression berechnet (s. Formel 2.2, S.41)

Statistische Auswertung:

$$(2.2) \quad (X = 2^{-(50-\Delta CT_{\text{läsionaleHaut}})-(50-\Delta CT_{\text{non-läsionaleHaut}})})$$

ΔCT : gegenüber dem House keeping-Gen normalisierter nach Abzug des Schwellen-Zyklus

Erläuterung: Die ΔCT -Werte wurden von 50 subtrahiert um für einen höheren Wert auch eine höhere mRNA-Expression der jeweiligen Untereinheit in der Haut zu erreichen und dadurch die relative Expression als positives Ergebniss darzustellen

Die Daten der qRT-PCR wurden graphisch als Boxplots dargestellt, die die Perzentilen 0, 25, 50 (Median), 75 und 100 zeigen. Die ΔCT -Werte wurden von 50 abgezogen, um zu erreichen, dass höhere Werte auch eine höhere mRNA-Expression bedeuten. Die verbundenen Wertepaare (läsional, non-läsional) wurden mit dem Wilcoxon-Test beurteilt. Lagen mehr als zwei nicht verbundene Wertepaare in der Gruppe vor, wurde der Mann-Whitney U-Test zum Vergleich zwischen zwei Gruppen nur dann angewandt, wenn im vorangegangenen Kruskal-Wallis-Test statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. War $p < 0,05$, wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.

2.4. Immunologische Untersuchungen

2.4.1. IgE (Immunglobulin E)

Die Bestimmung des Gesamt-IgEs aus dem Serum von AD- und atopienegativen Probanden erfolgte mit dem UniCAP Total IgE-Fluoroenzym-immunoassay. Pro Ansatz wurden jeweils 40 μl Probandenserum, 50 μl Konjugat, 50 μl Entwicklerlösung und 600 μl Stopplösung benötigt (s. Tab. 2.6, S.42). Die Proben wurde bei 37°C mit dem Gerät UniCAP 100 inkubiert. Dabei reagiert das kovalent an ImmunoCAP, die Nachweissubstanz, gebundene anti-IgE mit dem gesamt-IgE in der Serumprobe. Nach einem Waschgang werden Enzym-markierte Antikörper

gegen IgE dazu gegeben, wodurch sich Komplexe bilden. Ungebundene Enzym-anti-IgE werden nach der Inkubation ausgewaschen und der gebundene Komplex mit der Entwicklerlösung inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit der Stopplösung kann die Fluoreszenz des Eluats bestimmt und mit Hilfe einer Eichkurve ausgewertet werden. Nach der Messung wurden die Ergebnisse von der Software des UniCAP 100 berechnet und ausgedruckt. Der Messbereich des Tests liegt bei unverdünntem Serum zwischen 2-5000kilo-Units/Liter (kU/l). Bei einem IgE >5000kU/l wurde auf Nachbestimmungen verzichtet

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Total IgE Conjugate	β -Glucosidase Anti-IgE (monoklonaler Antikörper aus der Maus) Ca μ /ml, Natriumazid 0,06% Farbcode blau
anti-IgE ImmunoCAP	(monoklonaler Antikörper aus der Maus) Kathon CG 0,15%
Entwicklungslösung	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactosid 0,01% Kathon CG 0,05%
Stopplösung	Natriumkarbonat 4%

Tabelle 2.6.: Reagenzien für die IgE-Bestimmung

2.4.2. Screening auf Inhalations- und Nahrungsmittelallergien

Das Screening von Probanden auf Inhalations- (sx1) und Nahrungsmittelallergien (fx1) erfolgte über die Bestimmung allergenspezifischer IgE im Serum der Patienten. Das Testprinzip und die verwendeten Reagenzien entsprechen, bis auf den monoklonalen Maus-Antikörper im Konjugat, denen der Bestimmung des Gesamt-IgEs. Das jeweilige Allergen wird kovalent an das ImmunoCAP aus der Testlösung gebunden. Bei Zugabe des Patientenserums reagiert das spezifische IgE mit dem Allergen und bildet einen Komplex. Danach wird das unspezifische IgE abgewaschen und der Enzym-markierte Antikörper gegen IgE hinzugefügt. Nach der Inkubation werden ungebundene Enzym-anti-IgEs abgewaschen

und die zurückbleibenden Komplexe mit der Entwicklerlösung inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch die Stopplösung kann der Fluoreszenzwert im Verhältnis zu einer Eichkurve durch den UniCAP 100 ermittelt werden.

Kapitel 3.

Ergebnisse

3.1. Fragebogen und immunologisches Screening

Nach Auswertung der Ergebnisse des Fragebogens, der RT-PCR und der Immunhistochemie sowie unter Einbeziehung der in Kapitel 2.1.3 auf Seite 31 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien wurden 16 von 20 AD-Probanden und 11 von 17 hautgesunden Probanden in die endgültige Auswertung der Studie einbezogen. Nicht in die Studie mit aufgenommen werden konnten diejenigen hautgesunden Probanden bei denen sich in der immunologischen Untersuchung des Blutes erhöhte IgE-Werte zeigten. Weitere Kriterien, die zum Ausschluß aus der endgültigen Auswertung führten waren mangelnde Auswertbarkeit von immunhistochemischen oder PCR-Daten. Durch Auswertung des Fragebogens konnte die Diagnose AD bei allen in die Studie eingeschlossenen AD-Probanden bestätigt werden. Alle AD-Probanden erfüllten die Kriterien nach Hanifin und Rajka [RAJKA 1986]. Der Wert für die Hauptkriterien (maximal vier) lag bei allen AD-Probanden bei mindestens drei und erfüllte somit das geforderte Minimum von drei. Für die Nebenkriterien ergaben sich Werte zwischen 9 von 16 und 15 von 16 (gefordertes Minimum 4 von 16).

15 von 16 AD-Probanden konnten durch die Auswertung des Fragebogens nach Gupta „als high stress responder“ klassifiziert werden, d.h. sie reagieren mit einer subjektiven Verschlimmerung der AD auf körperlichen und psychischen Stress [GUPTA et al. 1989].

Die Dauer der AD lag bei den untersuchten AD-Probanden zwischen drei und 42 Jahren und unterschritt damit die im Vorfeld geforderte Mindesterkrankungsdauer von einem Jahr nicht. Das Alter der Probanden lag zwischen 18 und 47 Jahren und lag damit im vorgegebenen Limit (s. Tab. 3.1, S.46). Unter den 16 AD-Probanden waren 5 Nichtraucher, 7 Raucher und 4 Exraucher. In der Gruppe der hautgesunden Probanden waren 7 von 11 Nichtraucher, 4 von 11 Raucher und keine Exraucher.

Die SCORAD-Werte der AD-Probanden lagen zwischen 26,7 und 81,1 Punkten.

In Verbindung mit den Blutwerten für IgE, Inhalations- und Nahrungsmittelallergene ließ sich für 5 von 16 AD-Probanden ein extrinsischer, für 3 von 16 ein intrinsischer und für 8 von 16 ein gemischter AD-Typ aus dem Fragebogen bestimmen. Bei 12 von 16 AD-Probanden waren hierbei die IgE-Werte stark erhöht (Normwerte: 5-100kU/l). Bei den untersuchten hautgesunden Probanden lagen die Werte zwischen 5,57kU/l und 49,9kU/l und waren somit nie außerhalb der Normwertgrenzen. Für die Nahrungsmittelallergene (Fx-5, Normwert <0,35 kUA/l) ergaben sich bei 13 von 16, bei den Inhalationsallergenen (Sx-1, Normwert <0,35 kUA/l) bei 1 von 16 AD-Probanden erhöhte Werte. In der Gruppe der hautgesunden Probanden wurden weder erhöhte Werte für Nahrungsmittelallergene noch für Inhalationsallergene gefunden (s. Tab. 3.1, S.46)

AD-Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	Raucher	SCORAD	AD-Typ	IgE kU/l	FX-5 kUA/l	SX-1 kUA/l
P2	weiblich	43	ex	74	extrinsisch	>5000	>100	0,42
P5	männlich	42	nein	79,1	intrinsisch	40	6,28	<0,35
P6	weiblich	32	ex	39,5	gemischt	914	48,1	15,7
P7	männlich	28	ja	91	intrinsisch	>5000	>100	1,98
P8	weiblich	47	ja	47,3	extrinsisch	396	3,29	0,44
P9	männlich	34	ja	46,8	gemischt	1945	74,8	1,27
P10	weiblich	25	nein	81,1	extrinsisch	447	47,3	<0,35
P11	männlich	33	nein	47,4	gemischt	1411	>100	0,51
P12	weiblich	22	ex	57,8	gemischt	>5000	>100	2,7
P20	männlich	24	ja	38,5	extrinsisch	30,8	0,71	<0,35
P21	weiblich	20	ex	26,7	intrinsisch	19,8	<0,35	<0,35
P23	weiblich	23	ja	68,9	gemischt	173	1,56	<0,35
P30	männlich	23	ja	51,1	extrinsisch	74,1	<0,35	<0,35
P31	männlich	20	nein	54,3	gemischt	684	<0,35	11
P32	männlich	30	ja	70	gemischt	956	1,58	39,3
P35	männlich	33	nein	80,5	gemischt	>5000	82,1	>100

Kontrolle	Geschlecht	Alter (Jahre)	Raucher	IgE kU/l	fx-5 kUA/l	sx-1 kUA/l
K1	weiblich	25	ja	13,3	<0,35	<0,35
K2	weiblich	47	ja	37,8	<0,35	<0,35
K3	weiblich	28	ja	42,3	<0,35	<0,35
K4	männlich	32	nein	13,4	<0,35	<0,35
K7	männlich	24	nein	5,57	<0,35	<0,35
K12	weiblich	24	ja	16,2	<0,35	<0,35
K14	weiblich	24	ja	27,6	<0,35	<0,35
K20	männlich	24	ja	31,2	<0,35	<0,35
K21	weiblich	23	nein	16,4	<0,35	<0,35
K30	männlich	25	nein	10,2	<0,35	<0,35
K32	männlich	18	ja	49,9	<0,35	<0,35

Tabelle 3.1.: Klinische Charakteristiken von AD-Probanden (P) und hautgesunden Probanden (K): die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der mittels Fragebogen erhobenen Daten (s. A.1im Anhang A, S.98) sowie der gesamt-IgE-, Nahrungsmittel- (fx-5) und Aeroallergene (sx-1) von AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K). Die Benennung der Proben erfolgte nach einem studieninternen Schema, welches der Verblindung der Ergebnisse diente, wobei die Zahlen in der Bezeichnung der Probe nicht der tatsächlichen Probennummer entspricht.

3.2. HE-Färbung

Die Evaluation der HE-Färbung der AD-Haut ergab die für die AD typischen Zeichen Spongiose, Parakeratose, Hyperkeratose, Acantholyse und perivaskuläre Leukozyten in Epidermis und Dermis in der läsionalen Haut von 15 von 16 AD-Probanden sowie in der non-läsionalen Haut von 4 von 16 AD-Probanden (AD-Probanden P2, P5, P7 und P23). In den HE-Färbungen der non-läsionalen Haut der anderen 12 von 16 AD-Probanden sowie der läsionalen Haut von 1 von 16 AD-Probanden (AD-Proband P10) zeigte sich ein regelrechter Aufbau der Epidermis ohne Zeichen von Entzündung.

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. nAChR- $\alpha 3$ -Untereinheit

Die Fluoreszenz der $\alpha 3$ -Untereinheit war in der non-läsionalen AD-Haut und in der gesunden Haut sowohl in der Intensität als auch in der Lokalisation sehr ähnlich. Es zeigte sich starke Fluoreszenz in den Zellen des Stratum basale des Stratum germinativum der Epidermis (s. Abb. B.1 b und c, S.100). Die übrigen Schichten der Epidermis zeigten keine positive Immunreaktivität (IR). Weiterhin fand sich eine starke IR im Bereich des Gefäßendothels und eine mäßige IR in glatter Muskulatur von Arteriolen (s. Abb. B.1 f im Anhang, S.100), in den Myoepithelzellen ekkriner Drüsen und in der basalen Zellschicht der Ausführungsgänge der ekkrinen Drüsen (s. Abb. B.1 h im Anhang, S.100) sowie in den äußeren Zellschichten des Haarfollikels (s. Abb. B.1 g im Anhang, S.100). In den Nervenfaserbündeln der Dermis konnten auch $\alpha 3$ -positive Nervenfasern dargestellt werden (s. Abb. B.1 e im Anhang, S.100).

Dagegen war die Fluoreszenz in der läsionalen AD-Haut bei 9 von 12 AD-Probanden

(P3, P9, P10, P11, P20, P21, P30, P31, P32) in der Epidermis auch auf die suprabasalen Zellschichten ausgedehnt (s. Abb. B.1 a im Anhang, S.100). Bei 2 von 12 AD-Probanden war die IR stark vermindert und es war auch keine Ausbreitung auf die suprabasalen Schichten der Epidermis nachweisbar (P6 und P8). Bei 1 von 12 AD-Probanden war kein Unterschied in der IR in der Epidermis festzustellen (P8).

Zusätzlich wurden in der Dermis der läsionalen AD-Haut bei 9 von 15 AD-Probanden (P3, P6, P7, P8, P9, P12, P21, P32, P35) einzelne Zellen mit sehr starker $\alpha 3$ -IR gefunden, die mittels Toluidin-Blau-Färbung als Mastzellen identifiziert werden konnten (s. Abb. B.6 a und b im Anhang, S.105). Allerdings waren nicht alle Mastzellen in der Dermis der läsionalen AD-Haut auch $\alpha 3$ -positiv.

Die Intensität und die Lokalisation der $\alpha 3$ -IR in der läsionalen Haut der AD-Probanden war in Nervenfasern, Drüsen und Gefäßen im Vergleich zur non-läsionalen bzw. gesunden Haut unverändert.

3.3.2. nAChR- $\alpha 5$ -Untereinheit

Die IR der $\alpha 5$ -Untereinheit zeigte im Vergleich von non-läsionaler AD-Haut und gesunder Haut weder in der Intensität noch in der Lokalisation wesentliche Unterschiede (s. Abb. B.2 a, b und c im Anhang, S.101). In allen Schichten der Epidermis wurde IR der $\alpha 5$ -Untereinheit mit einem Intensitätsmaximum im Stratum spinosum gefunden. Außerdem zeigte sich eine starke IR im Bereich der Myoepithelzellen und der epithelialen Zellen der ekkrinen Drüsen sowie der apikalen Zellen der Drüsenausführungsgänge. Auch dermale Fibroblasten, Nervenfasern und Endothelien der Venolen und Arteriolen zeigten mäßige IR für die $\alpha 5$ -Untereinheit (s. Abb. B.2 d-h im Anhang, S.101).

In der läsionalen AD-Haut zeigte sich im Vergleich zur non-läsionalen Haut ver-

minderte IR im Bereich des Stratum basale der Epidermis bei 9 von 12 AD-Probanden (P6, P7, P9, P10, P11, P12, P20, P21, P30). Bei 3 von 12 AD-Probanden (P3, P8, P32) zeigte sich hingegen eine gegenüber der gesunden Haut verstärkte IR im Stratum basale. Toluidinblau positive dermale Mastzellen in der läsionalen AD-Haut wiesen bei 6 von 12 (P6, P7, P8, P9, P21, P35) AD-Patienten starke IR für die $\alpha 5$ -Untereinheit auf (s. Abb. B.6 c und d im Anhang, S.105). Nicht alle Toluidinblau positiven Mastzellen waren auch $\alpha 5$ -immunreaktiv. Bei den genannten AD-Probanden fanden sich jedoch auch $\alpha 3$ -positive Mastzellen. Die Intensität und die Lokalisation der $\alpha 5$ -IR in Drüsen, Gefäßen und Fibroblasten der Dermis war in der läsionalen AD-Haut gegenüber der non-läsionalen bzw. gesunden Haut hingegen nicht verändert.

3.3.3. nAChR- $\alpha 7$ -Untereinheit

Die IR der $\alpha 7$ -Untereinheit war in gesunder Haut und in non-läsionaler AD-Haut sowohl hinsichtlich der Intensität als auch der Verteilung gleich. In der Epidermis zeigten alle Schichten bis auf das Stratum basale starke IR in der Zellmembran der Keratinozyten (s. Abb. B.3 b und c, S.102). In der Dermis zeigten die Fibroblasten, die Nervenfasern, das Endothel der Gefäße sowie die glatte Muskulatur der Gefäße und die sich berührenden Zellmembranen zwischen luminaler und basaler Zellschicht in den Drüsenausführungsgängen der ekkrinen Drüsen mäßige bis starke IR für die $\alpha 7$ -Untereinheit (s. Abb. B.3 d-g im Anhang, S.102).

In der läsionalen Haut war die IR in der Epidermis bei 6 von 12 AD-Probanden (P6, P7, P8, P9, P11, P12) unverändert gegenüber der gesunden Haut. Bei 5 von 12 AD-Probanden (P3, P5, P20, P21, P30) war sie auf das Stratum granulosum beschränkt (s. Abb. B.3 a, S.102). Bei 1 von 12 AD-Probanden (P10) war die IR gegenüber der gesunden Haut verstärkt und auf alle Schichten der Epidermis

ausgeweitet.

In der Dermis zeigten sich im Bereich der Gefäße bei einigen AD-Probanden Ansammlungen mononukleärer Zellen (s. Abb. B.7 a im Anhang, S.106), ansonsten bestanden hier keine Unterschiede in der IR im Vergleich von läsionaler und non-läsionaler bzw. gesunder Haut.

3.3.4. nAChR- α 9-Untereinheit

Auch hier fanden sich keine merklichen Unterschiede zwischen der gesunden Haut und der non-läsionalen AD-Haut. In allen Schichten der Epidermis fand sich IR für die α 9-Untereinheit. Die IR war im Bereich des Stratum germinativum stark und in den anderen Bereichen der Epidermis eher mäßig (s. Abb. B.4 b und c im Anhang, S.103). Außerdem fand sich mäßige IR im Endothel und der glatten Muskulatur der Gefäße. Nervenfasern und Fibroblasten zeigten nur schwache IR (s. Abb. B.4 d-i im Anhang, S.103).

Unterschiede ergaben sich im Vergleich zwischen der läsionalen AD-Haut und der gesunden bzw. non-läsionalen (s. Abb. B.4 a im Anhang, S.103). So war die IR im Bereich des Stratum granulosum bei 8 von 13 AD-Probanden (P1, P3, P4, P5, P9, P10, P11, P30) weniger stark ausgeprägt und bei 5 von 13 (P6, P7, P8, P12, P21) unverändert.

In der Dermis von läsionaler AD-Haut zeigten sich im Vergleich zu non-läsionaler bzw. gesunder Haut, wie schon für die α 7-Untereinheit beschrieben, gelegentlich Ansammlungen von α 9-positiven Zellen im Bereich dermalen Gefäße (s. Abb. B.7 b im Anhang, S.106).

3.3.5. nAChR- α 10-Untereinheit

Im Vergleich zwischen gesunder Haut und der non-läsionalen AD-Haut fanden sich auch für die α 10-Untereinheit keine sichtbaren Unterschiede in der Immunhistochemie. IR für die α 10-Untereinheit war in allen Schichten der Epidermis mäßig vorhanden (s. Abb. B.5 b und c im Anhang, S.104). In einigen Hautproben war die IR im Stratum spinosum und Stratum granulosum verstärkt. Weiterhin zeigten die glatte Gefäßmuskulatur, das Endothel der Arteriolen in der Dermis sowie die Kapillarendothelien starke α 10-IR. Auch die Myoepithelzellen der ekkrinen Drüsen und die Zellen der Drüsenausführungsgänge sowie subepidermale dendritische Zellen waren mäßig α 10-immunreaktiv (s. Abb. B.5 g, h und e im Anhang, S.104). In Nervenfaserbündeln fand sich eine Subpopulation von Nervenfasern, die stark α 10-positiv waren (s. Abb. B.5 e im Anhang, S.104). Zudem zeigten die äußeren Schichten des Haarfollikels α 10-IR (s. Abb. B.5 f im Anhang, S.104).

In der läsionalen AD-Haut war die IR in allen Schichten der Epidermis vermindert (s. Abb. B.5 a im Anhang, S.104). In der Dermis fanden sich, wie auch für die α 7- und α 9-Untereinheit beschrieben, im Bereich der Gefäße Ansammlungen mononukleärer Zellen, die starke IR für die α 10-Untereinheit zeigten (s. Abb. B.7 c im Anhang, S.106). Sonst bestanden keine sichtbaren Unterschiede zur gesunden Haut bzw. non-läsionalen AD-Haut.

3.4. Quantitative RT-PCR

3.4.1. Vergleich zwischen gesunder und AD-Haut

In Übereinstimmung mit bereits bekannten Daten über das cholinerge System in der humanen Haut [KURZEN 2004], konnten die nAChR- α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 nachgewiesen werden (s. Abb. B.8 im Anhang B, S.107). Alle genannten Untereinheiten fanden sich in läsionaler und non-läsionaler AD-Haut und in der Haut von gesunden Probanden. Die relative mRNA-Expression in der Haut von gesunden Probanden war für die α -Untereinheiten 3 und 7 am höchsten und für die α -Untereinheit 5 am niedrigsten (s. Tab. 3.2 und 3.3, S.54 und 3.4, S.55).

In der läsionalen und non-läsionalen AD-Haut zeigte sich eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression der α -Untereinheiten 3, 7, 9 und 10, aber nicht für die α -Untereinheit 5 (Mann-Whitney Test, s. Abb. 3.1 S.57, 3.2 S.58 und 3.3 S.59 und Tab. 3.7 S.56). Die stärkste Reduktion und größte Differenz zwischen gesunder und AD-Haut zeigte sich für die α 9-Untereinheit. Die relative mRNA-Expression dieser Untereinheit war in der Haut von gesunden Probanden um das 12,7- bis 23,1fache höher, als in der Haut von AD-Probanden (s. Abb. 3.2, S.58).

3.4.2. Vergleich zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut

Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen AD-Haut wurden für die α -Untereinheiten 3, 9 und 10 nachgewiesen (Wilcoxon Matched Pairs Test und T-Test, s. Abb. 3.1 S.57, Abb. 3.2 S.58 und 3.3 S.59 und Tab. 3.2 S.54, 3.5 S.55, 3.6 und 3.7 S.56). Die relative mRNA-Expression der α 3-Untereinheit war in der läsionalen AD-Haut von 9 von 16 AD-Probanden signifikant erhöht (s. Abb. 3.1, S.57). Der maximale Anstieg betrug

dabei den 4,9fachen Wert der non-läsionalen Haut (AD-Proband P5)(relative Expression der läsionalen verglichen mit der non-läsionalen AD-Haut, 1 gegenüber 1.95 ± 1.35 , $p < 0.005$, Wilcoxon matched pairs test).

Im Gegensatz ergab sich für die mRNA-Expression der $\alpha 10$ -Untereinheit eine Verminderung in der läsionalen gegenüber der non-läsionalen Haut in 13 von 16 AD-Probanden (Wilcoxon matched pairs test, s. Abb. 3.3, S.59 und Tab. 3.6, S.56) mit einer maximalen Reduktion auf das 0.15fache des Wertes der non-läsionalen Haut (AD-Proband P30)(relative mRNA-Expression der läsionalen gegenüber der non-läsionalen Haut, 1 gegenüber 0.7 ± 0.3 fach).

Signifikante Unterschiede in der Expression der $\alpha 9$ -mRNA zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut wurden nur bei den AD-Probanden gefunden, bei denen die Biopsien an AD-typischen Lokalisationen wie der Ellenbeuge und der Kniebeuge entnommen worden waren. In diesen Proben fand sich eine geringe, aber signifikante Erhöhung der $\alpha 9$ -mRNA in der läsionalen gegenüber der non-läsionalen AD-Haut (non-läsionaler $50\text{-}\Delta\text{CT}$ -Wert 32.54 ± 2.0 ; läsionale $50\text{-}\Delta\text{CT}$ -Wert 34.26 ± 1.37 , $n=7$, $p=0.018$, t-Test, s. Abb. 3.2, S.58).

Auch für die $\alpha 7$ -Untereinheit ließ sich eine verminderte mRNA-Expression in der läsionalen AD-Haut von 11 von 16 AD-Probanden nachweisen (s. Tab. 3.4, S.55), welche aber in der statistischen Auswertung keine Signifikanz zeigte (Wilcoxon matched pairs Test).

Zusätzlich waren zwei der drei in dieser Studie verwendeten House-keeping-Gene in läsionaler und non-läsionaler AD-Haut unterschiedlich exprimiert.

3.4.3. Vergleich zwischen AD-Subtypen

Mittels der Ergebnisse der Blutuntersuchung (gesamt-IgE, fx5, sx1) wurden die AD-Probanden den Subgruppen intrinsische, extrinsische und gemischte AD zugeordnet. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-

Expression der α -Untereinheiten zwischen diesen Gruppen gefunden werden. Auch der Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern sowie zwischen Männern und Frauen brachte keine signifikanten Ergebnisse.

AD-Proband	läsional	non-läs.	rel. Ex.	Kontrolle	
P2	32,8	32,8	1,00	K1	41,4
P5	35,4	33,1	4,92	K2	37,2
P6	34,4	34,8	0,76	K3	33,5
P7	36,3	36,5	0,87	K4	34,6
P8	36,1	34,9	2,30	K7	39,1
P9	35,9	35,4	1,41	K12	35,9
P10	32,8	32,1	1,62	K14	32,9
P11	34,4	34,3	1,07	K20	33,8
P12	34,8	32,9	3,73	K21	38,2
P20	32,7	30,7	4,00	K30	41,0
P21	33,7	33,7	1,00	K32	37,2
P30	32,0	32,6	0,66		
P31	33,1	33,8	0,62		
P32	33,4	31,8	3,03		
P33	31,9	31,9	1,00		
P35	32,5	31,3	2,30		

Tabelle 3.2.: $\alpha 3$ -mRNA-Expression in AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K): die Tabelle gibt die $50 \cdot \Delta CT$ -Werte und die relative mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen Haut für die $\alpha 3$ -Untereinheit wieder.

AD-Proband	läsional	non-läs.	rel. Ex.	Kontrolle	
P2	32,1	31,7	1,30	K2	33,7
P5	31,1	33,7	0,7	K4	31,4
P6	32,1	32,2	0,9	K7	32,9
P8	35,1	37,3	0,2	K12	34,6
P9	33,2	31,9	2,5	K14	31,6
P10	32,8	31,8	2,0	K20	31,9
P11	33,4	33,1	1,2	K21	32,1
P12	31,7	30,8	1,9	K30	33,6
P20	31,2	30,6	1,5	K32	33,7
P21	32,2	32,2	1,00		
P30	31,3	32,1	0,6		
P31	31,8	32,7	0,5		
P32	32,1	32,0	1,1		
P35	32,1	30,7	2,6		
P33	31,9	31,9	1,00		
P35	32,5	31,3	2,30		

Tabelle 3.3.: $\alpha 5$ -mRNA-Expression in AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K): die Tabelle gibt die $50 \cdot \Delta CT$ -Werte und die relative mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen Haut für die $\alpha 5$ -Untereinheit wieder.

AD-Proband	läsional	non-läs.	rel. Ex.	Kontrolle	
P2	32,3	33,9	0,3	K1	40,4
P5	34,7	32,5	4,6	K2	37,0
P6	32,5	33,7	0,4	K3	35,2
P7	34,9	35,7	0,6	K4	33,3
P8	35,0	36,2	0,4	K7	39,7
P9	35,0	33,6	2,6	K12	31,6
P10	34,7	34,2	1,4	K14	35,0
P11	34,8	34,0	1,07	K20	35,3
P12	33,0	33,8	0,6	K21	38,9
P20	33,1	34,6	0,4	K30	41,3
P21	34,9	34,9	1,00	K32	37,0
P30	32,4	34,2	0,3		
P31	34,1	34,4	0,8		
P32	34,3	34,9	0,7		
P33	31,9	32,8	0,5		
P35	34,1	35,2	0,5		

Tabelle 3.4.: $\alpha 7$ -mRNA-Expression in AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K): die Tabelle gibt die 50- Δ CT-Werte und die relative mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen Haut für die $\alpha 7$ -Untereinheit wieder.

AD-Proband	läsional	non-läs.	rel. Ex.	Kontrolle	
P2	32,0	28,5	11,3	K1	40,0
P5	34,5	33,0	2,8	K2	36,4
P8	35,9	35,1	1,7	K3	34,0
P9	34,2	32,6	3,0	K7	39,6
P10	35,7	32,1	12,1	K12	35,9
P11	34,4	33,1	2,5	K14	30,3
P12	33,1	33,4	0,8	K20	33,5
P20	30,2	31,5	0,4	K21	38,6
P21	31,6	31,6	1,0	K30	41,1
P30	31,7	32,6	0,5	K32	36,4
P31	32,5	32,5	1,00		
P32	29,4	29,2	1,1		
P33	29,6	31,3	0,3		

Tabelle 3.5.: $\alpha 9$ -mRNA-Expression in AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K): die Tabelle gibt die 50- Δ CT-Werte und die relative mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen Haut für die $\alpha 9$ -Untereinheit wieder.

AD-Proband	läsional	non-läs.	rel. Ex.	Kontrolle	
P2	32,4	32,4	1,00	K1	40,2
P5	33,9	34,6	0,62	K2	35,5
P6	33,6	32,8	1,74	K3	34,9
P7	31,4	33,1	0,31	K4	35,7
P8	33,5	34,8	0,41	K7	32,4
P9	35,0	34,8	1,15	K12	33,4
P10	30,5	31,4	0,54	K14	33,4
P11	32,8	33,8	0,5	K20	32,6
P12	31,9	33,0	0,47	K21	35,0
P20	32,5	32,2	1,23	K30	36,9
P21	32,0	33,5	0,35	K32	31,3
P30	30,1	32,8	0,15		
P31	30,9	32,9	0,25		
P32	31,0	32,1	0,47		
P33	30,7	31,3	0,66		
P35	30,2	31,0	0,57		

Tabelle 3.6.: α 10-mRNA-Expression in AD-Probanden (P) und hautgesunden Kontrollprobanden (K): die Tabelle gibt die 50- Δ CT-Werte und die relative mRNA-Expression zwischen der läsionalen und non-läsionalen Haut für die α 10-Untereinheit wieder.

	läsional (50- Δ CT, $\bar{x} \pm \text{SD}$); (n)	non-läsional (50- Δ CT, $\bar{x} \pm \text{SD}$); (n)	Kontrolle (50- Δ CT, $\bar{x} \pm \text{SD}$); (n)
α 3	33,42 \pm 1,27 (14)	34,04 \pm 2,05 (14)	36,46 \pm 1,34 (9)
α 5	32,29 \pm 0,96 (16)	32,25 \pm 1,53 (16)	32,83 \pm 1,06 (10)
α 7	34,34 \pm 1,91 (14)	33,89 \pm 0,28 (14)	36,15 \pm 1,27 (11)
α 9	34,26 \pm 1,37 (13)	32,54 \pm 2,0 (13)	36,58 \pm 3,18 (10)
α 10	32,98 \pm 0,99 (16)	32,03 \pm 1,56 (16)	35,00 \pm 6,29 (11)

Tabelle 3.7.: Mittelwerte der mRNA-Expression in AD-Probanden und hautgesunden Kontrollprobanden: die Tabelle gibt die 50- Δ CT-Werte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) und der Anzahl der ausgewerteten Proben (n) wieder.

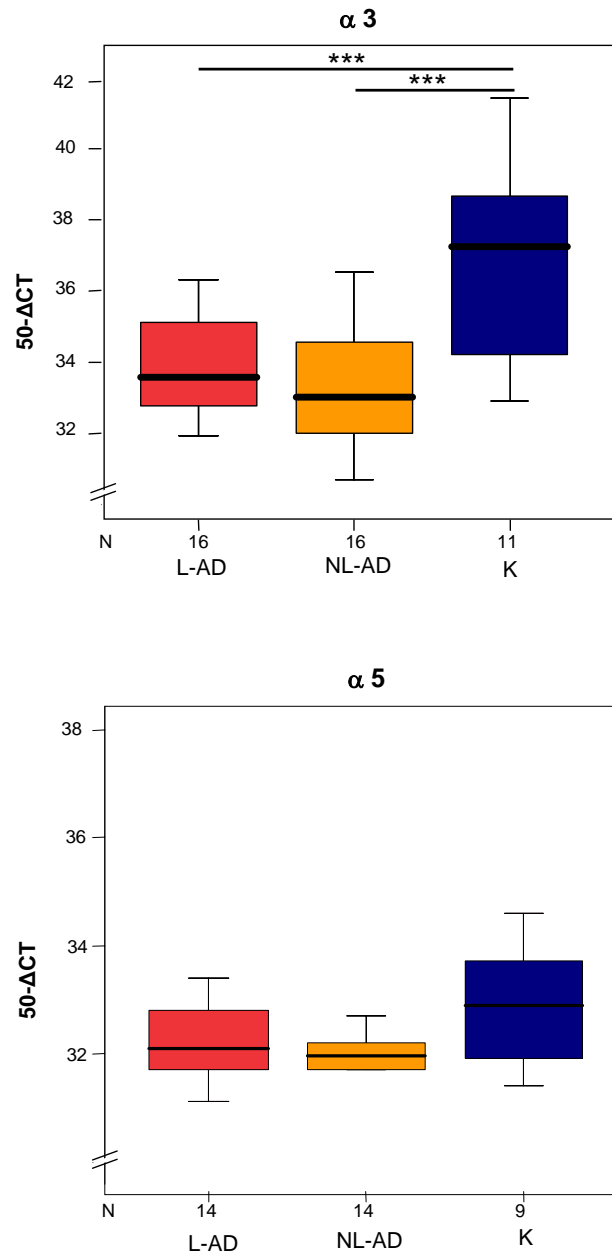


Abbildung 3.1.: RT-PCR-Ergebnisse der Expression der nAChR α -Untereinheiten 3 und 5 in der Haut: Die Boxplots der quantitativen RT-PCR stellen die Expression der nAChR α -Untereinheiten 3 und 5 in der läSIONalen und non-läSIONalen Haut von AD-Probanden sowie in der Haut von gesunden Kontrollprobanden dar. Sie zeigen die Perzentilen 0, 25, 50 (Median), 75 und 100. Die relative Expression der mRNA der α -Untereinheiten 3 und 5 wurde zum House-keeping Gen 18S des jeweiligen Probanden in Relation gesetzt. Zur besseren Darstellung wurden die Δ CT-Werte von 50 abgezogen, wodurch ein höherer Wert nun auch einer höheren Expression entspricht. L-AD = läSIONale AD-Haut, NL-AD = non-läSIONale AD-Haut, K = gesunde Kontrollprobandenhaut, N = Anzahl der untersuchten Probanden, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$.

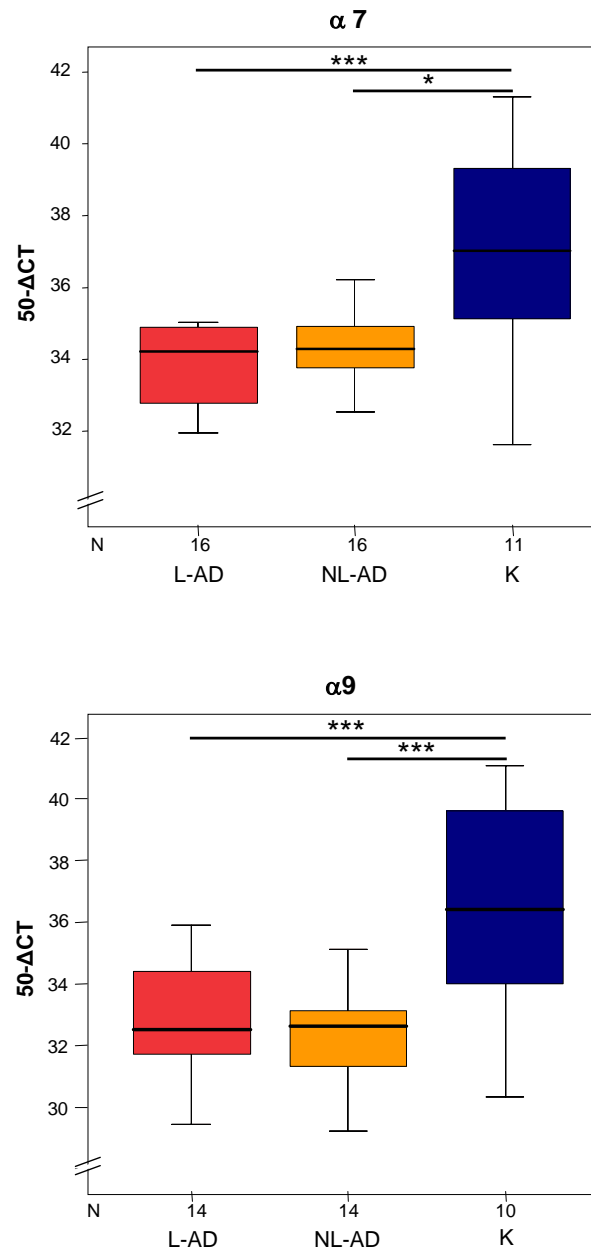


Abbildung 3.2.: RT-PCR-Ergebnisse der Expression der nAChR α -Untereinheiten 7 und 9 in der Haut: Die Boxplots der quantitativen RT-PCR stellen die Expression der nAChR α -Untereinheiten 7 und 9 in der läSIONalen und non-läSIONalen Haut von AD-Probanden sowie in der Haut von gesunden Kontrollprobanden dar. Sie zeigen die Perzentilen 0, 25, 50 (Median), 75 und 100. Die relative Expression der mRNA der α -Untereinheiten 7 und 9 wurde zum House-keeping Gen 18S des jeweiligen Probanden in Relation gesetzt. Zur besseren Darstellung wurden die Δ CT-Werte von 50 abgezogen, wodurch ein höherer Wert nun auch einer höheren Expression entspricht. L-AD = läSIONale AD-Haut, NL-AD = non-läSIONale AD-Haut, K = gesunde Kontrollprobandenhaut, N = Anzahl der untersuchten Probanden, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$.

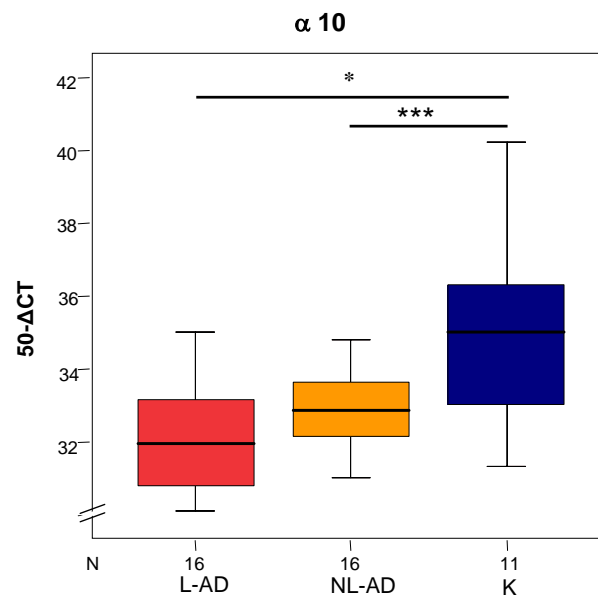


Abbildung 3.3.: RT-PCR-Ergebnisse der Expression der nAChR α -Untereinheit 10 in der Haut: Die Boxplots der quantitativen RT-PCR stellen die Expression der nAChR α -Untereinheit 10 in der läSIONalen und non-läSIONalen Haut von AD-Probanden sowie in der Haut von gesunden Kontrollprobanden dar. Sie zeigen die Perzentilen 0, 25, 50 (Median), 75 und 100. Die relative Expression der mRNA der α 10-Untereinheit wurde zum House-keeping Gen 18S des jeweiligen Probanden in Relation gesetzt. Zur besseren Darstellung wurden die Δ CT-Werte von 50 abgezogen, wodurch ein höherer Wert nun auch einer höheren Expression entspricht. L-AD = läSIONale AD-Haut, NL-AD = non-läSIONale AD-Haut, K = gesunde Kontrollprobandenhaut, N = Anzahl der untersuchten Probanden, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$.

Kapitel 4.

Diskussion

4.1. Das cholinerge System der Haut

Die Haut besitzt ein non-neuronales cholinerges System, welches eine Vielzahl von Funktionen der epidermalen und dermalen Zellen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, moduliert [ARREDONDO et al. 2003] [ARREDONDO et al. 2002] [ARREDONDO et al. 2001] [GRANDO 1997] [GRANDO et al. 1993].

Wie schon für andere epitheliale Zellen, wie z.B. die Zellen des respiratorischen Epithels beschrieben, besitzen auch die Keratinozyten Proteine zur Synthese und Freisetzung von ACh [PFEIL et al. 2003] [HABERBERGER et al. 2002] [GRANDO 1997] [GRANDO et al. 1993]. Wird das ACh von den Keratinozyten freigesetzt, so kann es mit den nikotinischen und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren verschiedener Zielzellen in Epidermis und Dermis interagieren.

Die AD ist durch die Veränderung der physiologischen Antwort der Haut auf verschiedene Reize charakterisiert. Auch die ACh-Synthese ist in der AD-Haut verändert, denn die Konzentration von ACh in der Haut von AD-Probanden ist in den epidermalen und subepidermalen Bereichen 14fach und in der tiefen Dermis 3fach gegenüber der gesunden Haut erhöht [KIRKPATRICK et al. 2003]. Dabei

scheint nicht nur die Synthese des AChs, sondern auch die Reaktion auf ACh verändert zu sein. Die intrakutane Injektion von ACh ruft nur in der läSIONalen Haut der AD-Probanden Juckreiz hervor [HEYER et al. 1997], während in non-läsionaler Haut und bei Hautgesunde Schmerz empfunden wird. Da beide Prozesse neuronal vermittelt sind, scheint ACh in der Lage zu sein, neuronale Stimuli zu beeinflussen. Die in der AD vorliegenden Veränderungen können zum einen durch Änderung der Rezeptorexpression (Anzahl und Zusammensetzung) und zum anderen durch Modulation der Signaltransduktion verursacht sein. Zusammengenommen kann dies zu einer veränderten Reizantwort, z.B. dem Juckreiz führen.

In unserer Studie haben wir die Hypothese überprüft, ob Veränderungen des cholinergen Systems und besonders der mRNA-Expression der nAChR eine Bedeutung für die Pathogenese der AD haben. Um diese Frage zu beantworten, haben wir die mRNA-Expression und die Lokalisation der verschiedenen nAChR- α -Untereinheiten in läSIONaler und non-läsionaler AD-Haut sowie in der Haut von gesunden Kontrollprobanden untersucht. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte die Differenzierung zwischen generell in der Haut von AD-Probanden auftretenden Effekten und Veränderungen, welche auf den läSIONalen Bereich der AD-Haut beschränkt waren.

In unsere Studie konnten wir nachweisen, dass die mRNA-Expression der α -Untereinheiten der nAChR, mit Ausnahme der $\alpha 5$ -Untereinheit, in der Haut von AD-Probanden im Vergleich zu hautgesunden Probanden vermindert ist und dass sich für die α -Untereinheiten 3, 9 und 10 auch Veränderungen in der Rezeptorlokalisation in der Epidermis zeigen lassen. Diese Veränderungen ließen sich sowohl auf translationaler als auch auf transkriptionaler Ebene nachweisen. Dabei waren die Veränderungen auf Rezeptorebene auf die läSIONale Haut beschränkt, während diejenigen der mRNA-Expression sowohl in läSIONaler als auch in non-läsionaler Haut nachweisbar waren. Dies zeigt, dass die Veränderungen in der AD nicht allein Folge der Entzündung sind, sondern eine generelle Veränderung der Haut

darstellen.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass außer den Keratinozyten auch dermale Fibroblasten, Nervenfasern, Drüsen, Haarfollikel sowie glatte Muskulatur und Endothel [LANG et al. 2005] der Gefäße Ziel für neuronal oder non-neuronal freigesetztes ACh sind.

Psychophysiologische Untersuchungen konnten demonstrieren, dass emotionaler Stress bei AD-Probanden zu einer Vasodilatation und dadurch bedingt zu vermehrtem Juckreiz und Kratzen führt [HANIFIN 1986]. Da bekannt ist, dass ACh einen vasodilatatorischen Effekt auf die peripheren Gefäße hat, könnte diese Reaktion auf die erhöhte Konzentration an ACh in der AD-Haut zurückgeführt werden.

Neben der AD an sich, kann auch die medikamentöse Therapie von Erkrankungen zu einer Veränderung der Rezeptorexpression im cholinergen System führen. So konnte gezeigt werden, dass in humaner Lunge die Synthese von ACh durch Glukokortikoidapplikation reduziert werden kann [REINHEIMER et al. 1998] [KAUFMAN et al. 1988] und dass die Anzahl von nAChRs [BRAUN et al. 1993] und MRs an der neuromuskulären Endplatte nach oben reguliert wird [MARQUARDT et al. 1982]. In der Therapie der AD ist die Applikation von Glukokortikoiden die ultima ratio. Sie werden sowohl topisch als auch systemisch angewandt und führen zum Abklingen von Juckreiz und Ekzemen.

Ob die Expression der Rezeptoren in der Haut von AD-Patienten an sich oder erst nach Glukokortikoidtherapie verändert ist, ist nicht bekannt.

Ausgehend von der Annahme, dass der vorhandene Anstieg der ACh-Synthese in AD zu einer Verminderung der Rezeptorexpression führt, würde die Verminderung der ACh-Synthese durch die Applikation von Glukokortikoiden eine Normalisierung der Rezeptorexpression hervorrufen. Die Anwendung von Glukokortikoiden also die Expression der α -Untereinheiten steigern sowie regulierend in die ACh-Synthese eingreifen.

4.2. Nerven, Gefäße und Mastzellen

Wie oben bereits erwähnt, ist ACh in der Lage neuronal vermittelte Reize wie Schmerz und Juckreiz zu modulieren. Dies weist darauf hin, dass Nervenfasern cholinerge Rezeptoren exprimieren über die ACh wirken kann. In unserer Studie konnten wir erstmals das Vorkommen von nAChR- α -Untereinheiten im vaskulären und neuronalen System der Haut von hautgesunden und AD-Probanden nachweisen.

4.2.1. nAChR- α -Untereinheiten in Nervenfasern

In verschiedenen dermalen Nervenfasersubpopulationen konnten wir alle untersuchten α -Untereinheiten nachweisen, was darauf hinweist, dass sie auf neuronal oder non-neuronal freigesetztes ACh in der Haut reagieren können. Dabei konnten zum ersten Mal Subpopulationen von Nervenfasern in der humanen Haut nachgewiesen werden, die α -Untereinheiten 7, 9 und 10 enthaltende nAChR besaßen. Dies bestätigt die elektrophysiologischen Daten zur nikotinabhängigen Erregung von sensiblen Nervenfasern in der Rattenhaut [BERNARDINI et al. 2001]. Die Stimulation von sensiblen Nervenfasern mit Nikotin führte in der humanen Haut zu einer initialen Vasodilatation sowie zu einer Steigerung der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion und der Hitze-induzierten Hautreaktionen [WARNER et al. 2004] [IZUMI und KARITA 1992]. Der Nachweis der α -Untereinheiten 3 und 5 in Nervenfasern deckt sich mit Ergebnissen aus funktionellen Untersuchungen von unmyelinisierten C-Fasern des humanen N. suralis. Hier wurde festgestellt, dass die Stimulation von $\alpha 3$ und 5 enthaltenden nAChRs mit Nikotin zu einer vermehrten Erregbarkeit des N. suralis führte [LANG et al. 2003] [LANG et al. 2005].

Da ACh als Agonist an den nAChR wirkt, würde man hier eine dem Niko-

tin gleichsinnige Veränderung der Erregbarkeit von unmyelinisierten C-Fasern durch ACh, d.h. eine gesteigerte Erregbarkeit der unmyelinisierten C-Fasern erwarten. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass Nikotin auf die α -Untereinheiten 9 und 10 einen antagonistischen Effekt hat. So würde man bei der Erregung dieser Fasern eine dem durch Nikotin hervorgerufenen Effekt gegenläufige Reaktion erwarten. Es könnte daher durch Erregung von Rezeptoren, welche die $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten enthalten zu einer Hemmung mit folgender Reduktion der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion [WARNER et al. 2004] [IZUMI und KARITA 1992] führen. Unter Stress würde dadurch die periphere Vasokonstriktion ausbleiben und eine erhöhte Hautdurchblutung resultieren, was beispielsweise den für die AD charakteristischen transdermalen Wasserverlust mitbedingen könnte.

Um die Rolle der neuronalen nAChR-Untereinheiten auf Nervenfasern in der Haut von AD-Patienten zu erklären, bedarf es weiterer Untersuchungen. Unsere Daten unterstützen die Ergebnisse zur Sensibilität der dermalen Nervenfasern für ACh. Insbesondere im Hinblick auf die α -Untereinheiten 7, 9 und 10 bleibt die Rolle im neuronalen System jedoch völlig unklar. Die hier verwendete real-time RT-PCR der Haut eignet sich jedoch nicht, um die mRNA-Expression von nAChR-Untereinheiten in den Nervenzellen zu bestimmen, da sich die zugehörigen Zellkörper der Haut in den Grenzstrangganglien des Rückenmarks befinden und periphere Anteile der Nerven keine mRNA enthalten. Daher müsste hier auf alternative Untersuchungsmethoden zurückgegriffen werden.

4.2.2. nAChR- α -Untereinheiten in Blutgefäßen

In der vorliegenden Studie konnte mittels IHC die zelltypspezifische Lokalisation von nAChR- α -Untereinheiten in dermalen Gefäßen des Menschen gezeigt wer-

den. Dabei ließen sich im Endothel dermalen Gefäße die α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 nachweisen. In den Kapillaren war lediglich die α -Untereinheit 10 zu finden. Die glatte Gefäßmuskulatur der dermalen Arteriolen zeigt IR für die α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10, während die der Venolen für die α -Untereinheiten 3 keine IR zeigte.

So konnte hier zum ersten mal die Verteilung der verschiedenen α -Untereinheiten der nAChR in den Blutgefäßen der humanen Haut charakterisiert werden. Die Ergebnisse zeigen eine vom Gefäßgebiet und Zelltyp abhängige Expression der verschiedenen nAChR-Untereinheiten. Die Stimulation dieser Rezeptoren könnte daher in den verschiedenen Teilen des vaskulären Systems zu unterschiedlichen Reaktionen führen. Die Anwesenheit von nAChR und ein vom Gefäßgebiet abhängiges Expressionsmuster konnte bereits in Arterien von Ratten gezeigt werden [BRUGGMANN et al. 2003].

Das Vorhandensein von nAChR auf Hautgefäßen wurde vermutet, da Nikotin zur Konstriktion von Gefäßen führte [MISERY 2004]. Stimulation von nAChR auf Endothelzellen durch Nikotin steigerte zudem die Angiogenese [JACOBI et al. 2002], verzögerte die Wundheilung [PETSCHKE et al. 2006] [JACOBI et al. 2002] [USUKI et al. 1998] [LEOW und MAIBACH 1998] und führte zu einer Beschleunigung der Hautalterung [MISERY 2004].

Die durch die Vasokonstriktion verminderte Durchblutung der Haut könnte hier für die Freisetzung angiogenesefördernder Metaboliten verantwortlich sein und dadurch eine verstärkte Neovaskularisation hervorrufen. Durch anhaltende Vasokonstriktion könnte es weiterhin zur Malnutrition der Haut mit Beschleunigung der Hautalterung und Verzögerung der Wundheilung kommen.

Dennoch bleibt der genaue Mechanismus der Nikotinwirkung auf die Haut unklar.

Der endogene Ligand ACh kann nach parakriner Freisetzung aus Endothelzellen [KUMMER und HABERBERGER 1999], Leukozyten [KAWASHIMA und FUJII 2003] oder Keratinozyten [GRANDO et al. 2006] den Gefäßdurchmesser und damit

die Durchblutung regulieren. Es ist bekannt, dass ChAT in humanen Endothelzellen [KIRKPATRICK et al. 2003] sowie CHT1 in glatter Gefäßmuskulatur und Endothelzellen von Mensch und Ratte [LIPS et al. 2003] vorhanden sind.

4.2.3. nAChR- α -Untereinheiten in Mastzellen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass humane Mastzellen in der Dermis verschiedene nAChR- α -Untereinheiten exprimieren. Eine IR für die $\alpha 10$ -Untereinheit war dabei sowohl in Mastzellen der Haut gesunder Kontrollprobanden als auch in der läsionalen und non-läsionalen AD-Haut zu finden. Die Expression von Proteinen der α -Untereinheiten 3 und 5 scheint dagegen nur auf Mastzellen der läsionalen AD-Haut beschränkt zu sein.

Den Mastzellen kommt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der atopischen Erkrankungen zu [TSAI et al. 2005] [NOVAK et al. 2005]. Der Effekt von ACh auf Mastzellen ist variabel. In Untersuchungen der Blase von Ratten konnte gezeigt werden, dass ACh eine Degranulation von Mastzellen verursacht [SPANOS et al. 1996], während Mastzellen im humanen Herz keine Reaktion auf ACh zeigten [PATELLA et al. 1995]. Über den Besatz dermalen Mastzellen mit ACh-Rezeptoren gibt es bislang keine Daten. Die Veränderungen der Zusammensetzung der nAChR könnte das Degranulationsverhalten der Mastzellen verändern und zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber ACh führen. Unsere Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass ACh in die Regulation der Mastzelldegranulation besonders in läsionaler AD-Haut eingreift. Die exakten Mechanismen der Interaktion zwischen ACh und den nAChR auf dermalen Mastzellen sind noch zu untersuchen.

4.3. nAChR- α -Untereinheiten in der Epidermis

In Übereinstimmung mit bereits bekannten Daten über das cholinerge System in der humanen Haut [KURZEN 2004], konnten die nAChR- α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 nachgewiesen werden. Alle genannten Untereinheiten fanden sich in läsionaler und non-läsionaler AD-Haut und in der Haut von gesunden Probanden. In läsionaler und non-läsionaler AD-Haut fand sich dabei gegenüber den gesunden Probanden eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression, während sich Veränderungen auf Proteinebene lediglich in der läsionalen AD-Haut nachweisen ließen.

Die generelle Verminderung der mRNA-Expression in der Haut von AD-Probanden weist darauf hin, dass es sich hier nicht um eine sekundär durch den Entzündungsprozess bedingte Veränderung handelt, sondern um einen für die AD-Haut charakteristischen Effekt.

4.3.1. α 3-Untereinheit

Die mRNA-Expression der α 3-Untereinheit war wie die aller anderen Untereinheiten - mit Ausnahme der α 5 Untereinheit - in der Haut von AD Patienten signifikant verringert. Allerdings zeigte sich hier im Gegensatz zu allen anderen Untereinheiten ein Unterschied in der mRNA-Expression zwischen läsionaler und nicht läsionaler Haut. Die entzündete AD-Haut zeigte eine signifikant höhere α 3-mRNA Expression, die mit einer Zunahme α 3-immunreaktiven Zellen in der Epidermis einherging. Die höhere mRNA-Expression von α 3-mRNA in läsionaler gegenüber non-läsionaler AD-Haut lässt sich durch die höhere Anzahl an α 3-positiven Zellen in der Epidermis erklären. Dennoch ist die Expression in der AD dramatisch vermindert. Dies könnte für die charakteristischen Veränderungen der AD-Haut verantwortlich sein. Sowohl an α 3-knock-out Mäusen als auch

durch Blockierung der $\alpha 3$ -Untereinheit in der Zellkultur, konnte die Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen werden [NGUYEN et al. 2004]. Die daraus resultierenden Veränderungen ähneln der in der läsionalen AD-Haut vorkommenden Akantholyse und könnten erklären, warum es zu einer Störung der Hautbarrierefunktion in der Haut von AD-Patienten kommt. Wir konnten hier zeigen, dass sich die IR in der Epidermis der läsionalen AD-Haut auf die suprabasalen Zellschichten der Epidermis ausdehnt. Dies korreliert mit Daten von Studien, die an Keratinozyten in Zellkulturen erhoben wurden. Danach zeigen undifferenzierte, bewegliche Keratinozyten nAChRs, die die $\alpha 3$ -Untereinheit beinhalten [ZIA et al. 2000]. In der läsionalen AD-Haut kommt es durch die Differenzierungsstörung zu einer Anhäufung dieser Frühstadien der Keratinozyten. Daraus lässt sich eine essentielle Rolle der $\alpha 3$ -Untereinheiten für die Hautbarrierefunktion ableiten.

4.3.2. $\alpha 5$ -Untereinheit

Für die $\alpha 5$ -Untereinheit fanden sich dagegen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene Unterschiede zwischen AD-Haut und der Haut gesunder Kontrollen.

Da die α -Untereinheiten 3 und 5 zusammen mit den β -Untereinheiten 1, 2 und 4 Heteropentamere bilden, erscheint es zunächst ungewöhnlich, dass hier keine gleichsinnige Veränderung in der mRNA-Expression vorliegt. Dies weist auf eine veränderte Stöchiometrie der $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 4$ enthaltenden nAChR in AD-Haut hin, was die Rezeptorfunktion und damit die durch den Rezeptor vermittelten Effekte beeinflusst und auf eine AD-abhängige Veränderung dieser Subpopulation hindeuten. [LINDSTROM 1996] [LINDSTROM 2003] [DAJAS-BAILADOR und WONNACOTT 2004].

4.3.3. $\alpha 7$ -Untereinheit

Die Untersuchung der $\alpha 7$ -Untereinheit ergab, dass die mRNA zwar in der Haut von AD-Probanden weniger stark exprimiert war, dass sich aber hinsichtlich der Lokalisation keine sichtbaren Unterschiede in der Epidermis feststellen ließen. Obwohl über die Rolle der $\alpha 7$ -Untereinheit in inflammatorischen Geweben bereits viele Erkenntnisse vorliegen und dies auch auf eine Beteiligung von $\alpha 7$ -nAChR im Entzündungsgeschehen der AD schließen ließ, konnten wir hier keine signifikanten Veränderungen zwischen der läsionalen und non-läsionalen AD-Haut feststellen. In Untersuchungen an Keratinozyten in Zellkultur und $\alpha 7$ -knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die $\alpha 7$ -Untereinheit in der Epidermis eine wichtige Rolle für den Ablauf des Zellzyklus, für die Zelldifferenzierung und die Apoptose der Zellen spielt [ARREDONDO et al. 2002] [ARREDONDO et al. 2003]. Sowohl die Zelldifferenzierung als auch die regelrechte Einleitung der Apoptose sind in der Epidermis der läsionalen Haut von AD-Patienten gestört. Die verminderte Expression der $\alpha 7$ -Untereinheit könnte also sowohl die Zelldifferenzierung als auch die Einleitung der Apoptose verzögern, wodurch sich die morphologischen und funktionellen Veränderungen der AD-Haut erklären ließen.

Die fehlende Veränderung hinsichtlich Lokalisation des Proteins könnte dadurch erklärt werden, dass der eingesetzte Antikörper nur eine der $\alpha 7$ -Isoformen erkennt, sich die Veränderungen aber im Bereich der anderen Isoform abspielen. An $\alpha 7$ -knock-out Mäusen wurden auch Veränderungen in der mRNA-Expression der α -Untereinheiten 3, 5, 9 und 10 gefunden, was auf eine enge Verknüpfung der Funktionen dieser Untereinheiten hinweist. Durch eine Dysbalance in diesem System könnte also die Homöostase gestört und die Funktion der einzelnen Rezeptoren verändert sein.

4.3.4. α 9-Untereinheit

Die Ergebnisse unserer Studie ergaben eine verminderte mRNA-Expression der α 9-Untereinheit in der Haut von AD-Probanden gegenüber den hautgesunden Kontrollprobanden sowie eine leicht, aber dennoch signifikante Erhöhung der mRNA-Expression in der läsionalen gegenüber der non-läsionalen AD-Haut, wenn die Hautproben von typischen Lokalisationen von AD entnommen wurden (s. Tab. 3.5, S.55 und 3.1, S.46). Immunhistochemisch ließ sich eine verminderte Intensität der IR im Stratum granulosum der läsionalen Haut bei gleichzeitiger Zunahme der IR in dermalen fibroblastenartigen Zellen nachweisen.

Die Anwesenheit der α 9-Untereinheit auf dermalen Fibroblasten (DF) ist aus früheren Experimenten bekannt [ARREDONDO et al. 2002]. Allerdings ist über ihre Funktion an den DF bis heute nichts bekannt. Den α 9-Untereinheiten enthaltenen Rezeptoren kommt eine wichtige Rolle in der Apoptose-Induktion [NGUYEN et al. 2001] und in der Entwicklung des Stratum corneum zu [KURZEN 2004]. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Verminderung der α 9-Untereinheit in einer Störung der Hautbarrierefunktion resultieren kann, da diese zum großen Teil von einer intakten Hornschicht abhängt.

Zusätzlich ist die α 9-Untereinheit zusammen mit der α 3-Untereinheit und dem M3-mAChR an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Durch pharmakologische Deaktivierung dieser Rezeptoren in Keratinozyten kam es zur Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte und zu Veränderungen in der mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und β - und γ -Catenine [NGUYEN et al. 2003] [NGUYEN et al. 2004]. Dies wurde bereits im Zusammenhang mit Pemphigus vulgaris, einer Autoimmunerkrankung der Haut, welche eine ausgeprägte Akantholyse mit sich bringt, gezeigt [GRANDO et al. 2006]. Es bilden sich hier Autoantikörper, die an α 9-haltige Rezeptoren binden und diese blockieren. Bezogen auf die AD könnte die Reduktion dieser Untereinheit für die Entstehung der Akantolyse, d.h. der Auflösung des Zellverbands durch Verlust der Adäsions-

moleküle, mitverantwortlich sein. Dadurch kann es zu vermehrtem transdemalen Wasserverlust und einer verminderten Infektabwehr der Haut kommen.

Die $\alpha 9$ -Expression ist in der AD-Haut sowohl auf translationaler als auch auf transkriptionaler Ebene vermindert. Signifikante Unterschiede zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut ließen sich allerdings nur in den Hautarealen zeigen, in denen die AD typischerweise auftritt. Dies könnte aber daran liegen, dass auch für die $\alpha 9$ -Untereinheit, wie schon für die $\alpha 3$ - und $\beta 2$ -Untereinheit beschrieben [GRANDO et al. 2006], Unterschiede in der Lokalisation und mRNA-Expression zwischen verschiedenen Körperregionen bestehen.

4.3.5. $\alpha 10$ -Untereinheit

Unsere real-time RT-PCR-Ergebnisse haben gezeigt, dass die mRNA der $\alpha 10$ -Untereinheit in der AD-Haut vermindert exprimiert wird und dass sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut nachweisen ließ (s. Tab. 3.6, S.56). Es zeigte sich dabei eine geringere mRNA-Expression der $\alpha 10$ -Untereinheit in der läsionalen AD-Haut. Die Lokalisation des Proteins der Untereinheit war in der läsionalen Haut ebenfalls verändert. Die IR war in den Zellen der Epidermis vermindert, während nun perivaskuläre $\alpha 10$ -immunreaktive Zellen auftraten.

Über die Funktion der $\alpha 10$ -Untereinheit ist bis heute nur wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass trotz großer Sequenzhomologie zwischen $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten die $\alpha 10$ -Untereinheit nicht, wie die $\alpha 9$ -Untereinheit in der Lage ist, homopentamere Rezeptoren zu bilden [SGARD et al. 2002]. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Lokalisationen der α -Untereinheiten 9 und 10 sich in vielen Fällen entsprechen und dass diese Untereinheiten gemeinsam funktionsfähige Heteropentamere bilden können.

Die generelle Verminderung der mRNA der $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheit in der Haut von AD-Probanden deutet auf einen Verlust an funktionsfähigen Rezeptoren hin. Da die $\alpha 10$ -Untereinheit keine funktionsfähigen Homopentamere ausbilden kann, würde der Verlust der koexprimierten $\alpha 9$ -Untereinheit einem kompletten Funktionsverlust gleichkommen.

Bei den $\alpha 10$ -immunreaktiven Zellansammlungen im Bereich der Blutgefäße in der läsionalen AD-Haut könnte es sich um Lymphozyten handeln, die im Rahmen der Entzündungsreaktion aus den Gefäßen ausgetreten sind. Die mRNA-Expression von $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten in Lymphozyten konnte bereits gezeigt werden, was eine Modulation des Immunsystems durch das cholinerge System vermuten lässt [PENG et al. 2004]. Da besonders dem TH-Zell-Gleichgewicht Bedeutung beigemessen wird, bleibt zu untersuchen, ob sich dieses System durch Stimulation von nAChR modulieren lässt.

4.4. Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass die nAChR- α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 in verschiedenen neuronalen und non-neuronalen Zellen der humanen Haut zu finden sind. Die mRNA-Expression der Untereinheiten 3, 7, 9 und 10 ist unabhängig von der Entzündungsreaktion - sprich Läsion - in der Haut von AD-Probanden vermindert. Die α -Untereinheiten 3, 9 und 10 zeigen außerdem eine unterschiedliche mRNA-Expression in läsionaler gegenüber non-läsionaler Haut. Unterschiede auf Proteinebene konnten dagegen nur zwischen der Haut Gesunder und läsionaler AD-Haut, nicht aber zwischen gesunder Haut und non-läsionaler AD-Haut nachgewiesen werden.

Während es sich bei den immunhistochemisch nachweisbaren Veränderungen in der läsionalen AD-Haut auch um eine Reaktion der Keratinozyten auf den Ent-

zündungsreiz handeln kann, weist die generell reduzierte mRNA-Expression der α -Untereinheiten 3, 7, 9 und 10 auf eine höherer Anfälligkeit der Haut der AD-Patienten gegenüber Triggerfaktoren von Inflammation, Ekzemen und Störungen der Hautbarrierefunktion hin.

4.5. Klinische Relevanz

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression und Lokalisation der nAChR-Untereinheiten bildet eine unabdingbare Voraussetzung für pharmakologische Intervention. Durch weitere Untersuchungen muss geklärt werden, ob durch die Entwicklung von Medikamenten, die selektiv an den in der AD veränderten Rezeptoren angreifen, eine spezifische Therapie der AD ermöglicht werden kann. Mit der Erschließung von kausalen Therapieoptionen ließen sich viele unerwünschte Nebenwirkungen der heutigen symptomatischen Therapie, z.B. mittels Glukokortikoiden, vermeiden.

Kapitel 5.

Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung (deutsch)

Die Haut besitzt ein cholinerges System, welches aus Acetylcholin (ACh) synthetisierenden Enzymen sowie aus Transportern und Rezeptoren für ACh besteht. In der Haut finden sich hohe Konzentrationen von ACh. Dieses wird von Keratinozyten, Nervenfasern, ekkrinen Drüsen, Zellen des Gefäßendothels und von Leukozyten freigesetzt und kann dann an die muskarinischen (MR) und nikotinischen ACh Rezeptoren (nAChR) auf Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und Drüsenzellen binden. Die Stimulation dieser Rezeptoren spielt eine große Rolle für die Motilität, das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten und Fibroblasten.

In der Haut von Patienten die an atopischer Dermatitis (AD) leiden, zeigen sich Veränderungen in diesem System. Es konnte gezeigt werden, dass die Haut dieser Patienten eine höhere Konzentration von ACh enthält und dass die sensible Antwort auf ACh gegenüber der gesunden Haut verändert ist.

Um herauszufinden welche Rolle die nAChR in der Pathogenese der AD spielen, wurde die mRNA-Expression und die Lokalisation der neuronalen nAChR-

α -Untereinheiten in Hautbiopsien von läsionaler und non-läsionaler AD-Haut sowie von gesunden Probanden mittels real-time RT-PCR und Immunhistochemie untersucht. Die immunhistochemischen Daten zeigten, dass die nAChR- α -Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 in vielen neuronalen und non-neuronalen Zellen der gesunden und der AD-Haut vorhanden sind. Zusätzlich konnten einzelne Untereinheiten zum ersten Mal in Nervenfasern und Blutgefäßen der Haut nachgewiesen werden. In der real-time RT-PCR konnten wir außerdem die mRNAs der Untereinheiten 3, 5, 7, 9 und 10 nachweisen. Dabei zeigte sich eine von der Entzündungsreaktion unabhängige, reduzierte mRNA-Expression der α -Untereinheiten 3, 7, 9 und 10 in läsionaler wie non-läsionaler Haut von AD-Patienten. Im Vergleich zwischen läsionaler und non-läsionaler AD-Haut konnten Unterschiede für die mRNA-Expression der Untereinheiten 3, 9 und 10 gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Expression der α 9-Untereinheit war nur dann zu erkennen, wenn die Biopsie von AD-typischen Lokalisationen wie der Ellen- und Kniebeuge entnommen wurde. Die Erhöhung der mRNA-Expression der α 3-Untereinheit in der läsionalen Haut war mit einer vermehrten Anzahl an α 3-positiven Keratinozyten in der Epidermis verbunden. Für die α -Untereinheiten 9 und 10 zeigte sich unterdessen eine gegenläufige Regulation zwischen mRNA-Expression und immunhistochemischen Ergebnissen.

Im Vergleich zwischen intrinsischem, extrinsischem und gemischtem AD-Typ sowie zwischen Geschlecht und Rauchern/Nichtrauchern konnten in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von nAChR- α -Untereinheiten festgestellt werden.

Obwohl sich in der AD-Haut eine generelle Verminderung der mRNA-Expression der α -Untereinheiten 3, 7, 9 und 10 gegenüber der Haut von gesunden Kontrollprobanden zeigte, konnten Veränderungen auf Proteinebene nur für die läsionale AD-Haut festgestellt werden.

Während die Veränderungen in der läsionalen AD-Haut auch eine Folge der Inflammation sein können, weist die generelle Verminderung der mRNA-Expression

in der AD-Haut auf eine höhere Anfälligkeit für Störungen der Hautbarrierefunktion sowie für Triggerfaktoren von Entzündung und Ekzem hin.

5.2. Abstract (english)

The skin contains a cholinergic signalling system which consists of synthesizing enzymes, transporters and receptors for acetylcholine (ACh). High amounts of ACh are present in the skin, and ACh, synthesized and released from keratinocytes, nerve fibres, eccrine glands, vascular endothelial cells and leukocytes, interacts with muscarinic (MR) and nicotinic ACh receptors (nAChR) on keratinocytes, skin fibroblasts, sebocytes and eccrine glands. Receptor stimulation is important for motility, growth and differentiation of keratinocytes and fibroblasts.

The cutaneous cholinergic system is modulated in atopic dermatitis (AD). The skin of AD patients contains higher amounts of ACh and shows changes in the sensitivity to ACh.

To understand the role of nAChR in the pathogenesis of AD we investigated the mRNA-expression and localisation of neuronal nAChR- α -subunits in AD by real-time RT-PCR and immunohistochemistry using biopsies from lesional and non-lesional areas of AD skin and skin biopsies from healthy control persons. Our immunohistochemical data demonstrate the presence of the nAChR- α subunits 3, 5, 7, 9 and 10 in a variety of neuronal and non-neuronal cells of healthy and AD skin and provide the first description of individual subunits in the skin vasculature and nerve fibres. The mRNAs for the α -subunits 3, 5, 7, 9 and 10 were detected in healthy and AD skin. mRNA-Expression of the subunits 3, 7, 9 and 10 was generally reduced in the skin of AD patients. Differences in the subunit-mRNA levels between lesional and non-lesional skin were obtained for the α -subunits 3, 9 and 10 with reciprocal changes of the mRNA levels of the α 3- and α 10-subunits. An

increase of the α -subunit mRNA was present in lesional areas of the cubital and popliteal region. The higher $\alpha 3$ -mRNA level of lesional areas was accompanied by an increased number of $\alpha 3$ -immunoreactive keratinocytes in the lesional epidermis. Immunohistochemical alterations in the lesional AD-skin were also found for the α -subunits 9 and 10, but unlike 3 immunohistochemistry and PCR of these subunits showed reciprocal results. No differences in the mRNA-expression of the α -subunits could be found between the groups of extrinsic, intrinsic or mixed AD-types, between gender and smoker/non-smoker.

Even though AD-skin showed a general reduction of mRNA-levels of the α -subunits 3, 7, 9 and 10, regardless if it was lesioned or non-lesioned, alterations on protein-level were only found in the lesional AD-skin. While the diversification in lesional AD-skin could be a result to the inflammation, the general decrease of mRNA-levels in AD-skin might contribute to a higher susceptibility to triggers of inflammation, eczema and changes in skin's barrier function.

Literaturverzeichnis

[ABERG 1993]

N. ABERG (1993). *Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors*. Clin.Exp.Allergy, 23(10):829–834.

[ACKERMAN 1978]

A. B. ACKERMAN (1978). *Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases*. Lea & Febiger, Philadelphia.

[AIZEN und GILHAR 2001]

E. AIZEN und A. GILHAR (2001). *Smoking effect on skin wrinkling in the aged population*. Int.J.Dermatol., 40(7):431–433.

[ARREDONDO et al. 2005]

J. ARREDONDO, A. I. CHERNYAVSKY, L. M. MARUBIO, A. L. BEAUDET, D. L. JOLKOVSKY, K. E. PINKERTON und S. A. GRANDO (2005). *Receptor-mediated tobacco toxicity: regulation of gene expression through alpha3beta2 nicotinic receptor in oral epithelial cells*. Am.J.Pathol., 166(2):597–613.

[ARREDONDO et al. 2003]

J. ARREDONDO, L. L. HALL, A. NDOYE, V. T. NGUYEN, A. I. CHERNYAVSKY, D. BERCOVICH, A. ORR-URTREGER, A. L. BEAUDET und S. A. GRANDO (2003). *Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine*. Lab.Invest., 83(2):207–225.

[ARREDONDO et al. 2002]

J. ARREDONDO, V. T. NGUYEN, A. I. CHERNYAVSKY, D. BERCOVICH, A. ORR-URTREGER, W. KUMMER, K. LIPS, D. E. VETTER und S. A. GRANDO (2002). *Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium*. J.Cell Biol., 159(2):325–336.

[ARREDONDO et al. 2001]

J. ARREDONDO, V. T. NGUYEN, A. I. CHERNYAVSKY, D. L. JOLKOVSKY, K. E. PINKERTON und S. A. GRANDO (2001). *A receptor-mediated mechanism of nicotine toxicity in oral keratinocytes*. Lab Invest., 81(12):1653–1668.

[BENWELL et al. 1988]

M. BENWELL, D. BALFOUR und J. ANDERSON (1988). *Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H] nicotine binding sites in human brain*. J.Neurochem., 50:1243–1247.

[BERGER et al. 1986]

E. G. BERGER, E. AEGERTER, T. MANDEL und H. P. HAURI (1986). *Monoclonal antibodies to soluble, human milk galactosyltransferase (lactose synthase A protein)*. Carbohydr.Res., 149(1):23–33.

- [BERNARDINI et al. 2001]
N. BERNARDINI, S. K. SAUER, R. HABERBERGER, M. J. FISCHER und P. W. REEH (2001). *Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin*. J.Neurosci., 21(9):3295–3302.
- [BOLLINGER 1993]
A. BOLLINGER (1993). *Microlymphatics of human skin*. Int.J.Microcirc.Clin.Exp., 12(1):1–15.
- [BRAUN et al. 2001]
J. BRAUN, T. EPPINGER und H. RENZ-POLSTER; H. RENZ-POLSTER (Hrsg.) und J. BRAUN (Hrsg.) (2001). *Immunsystem*. In: *Innere Medizin*, Bd. 1, S. 326–388. Urban & Fischer, München, Jena, 2. Auflage.
- [BRAUN et al. 1993]
S. BRAUN, V. ASKANAS, W. K. ENGEL und E. N. IBRAHIM (1993). *Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle*. J.Neurochem., 60(5):1929–1935.
- [BREATHNACH 1971]
A. S. BREATHNACH (1971). *An Atlas of the Ultrastructure of the Human Skin*, Bd. 1. Churchill, London, 1. Auflage.
- [BRUGGMANN et al. 2003]
D. BRUGGMANN, K. S. LIPS, U. PFEIL, R. V. HABERBERGER und W. KUMMER (2003). *Rat arteries contain multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits*. Life Sci., 72(18-19):2095–2099.
- [BÜCHNER 2001]
S. A. BÜCHNER (2001). *Atopische Dermatitis*. Schweiz Med Forum., Nr.19,2001:484–490.
- [CAULFIELD und BIRDSALL 1998]
M. P. CAULFIELD und N. J. BIRDSALL (1998). *International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors*. Pharmacol.Rev., 50(2):279–290.
- [CORRINGER et al. 2000]
P. J. CORRINGER, N. N. LE und J. P. CHANGEUX (2000). *Nicotinic receptors at the amino acid level*. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 40:431–458.
- [DAJAS-BAILADOR und WONNACOTT 2004]
F. DAJAS-BAILADOR und S. WONNACOTT (2004). *Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling*. Trends Pharmacol.Sci., 25(6):317–324.
- [DAJAS-BAILADOR et al. 2002]
F. A. DAJAS-BAILADOR, A. J. MOGG und S. WONNACOTT (2002). *Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores*. J.Neurochem., 81(3):606–614.
- [DENDA et al. 2003]
M. DENDA, S. FUZIWARA und K. INOUE (2003). *Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis*. J.Invest.Dermatol., 121(2):362–367.

- [DHEIN et al. 2001]
S. DHEIN, C. J. VAN KOPPEN und O. E. BRODDE (2001). *Muscarinic receptors in the mammalian heart*. Pharmacol.Res., 44(3):161–182.
- [EBLING 1987]
F. J. EBLING; A. J. MITCHELL (Hrsg.) und A. E. KRULL (Hrsg.) (1987). *The biology of hair*. In: *Hair Disorders, Dermatologic Clinics*, S. 467–481. W.B.Saunders, Philadelphia.
- [EDELSTEIN und CHANGEUX 1998]
S. J. EDELSTEIN und J. P. CHANGEUX (1998). *Allosteric transitions of the acetylcholine receptor*. Adv.Protein Chem., 51:121–184.
- [ELGOYHEN et al. 1994]
A. B. ELGOYHEN, D. S. JOHNSON, J. BOULTER, D. E. VETTER und S. HEINEMANN (1994). *Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells*. Cell, 79(4):705–715.
- [ELGOYHEN et al. 2001]
A. B. ELGOYHEN, D. E. VETTER, E. KATZ, C. V. ROTHLIN, S. F. HEINEMANN und J. BOULTER (2001). *alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 98(6):3501–3506.
- [ERICKSON et al. 1994]
J. D. ERICKSON, H. VAROQUI, M. K. SCHAFER, W. MODI, M. F. DIEBLER, E. WEIHE, J. RAND, L. E. EIDEN, T. I. BONNER und T. B. USDIN (1994). *Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus*. J.Biol.Chem., 269(35):21929–21932.
- [ERNSBERGER und ROHRER 1999]
U. ERNSBERGER und H. ROHRER (1999). *Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons*. Cell Tissue Res., 297(3):339–361.
- [ERNSTER et al. 1995]
V. L. ERNSTER, D. GRADY, R. MIIKE, D. BLACK, J. SELBY und K. KERLIKOWSKIE (1995). *Facial wrinkling in men and women, by smoking status*. Am.J.Public Health, 85(1):78–82.
- [FARTASCH 1997]
M. FARTASCH (1997). *Epidermal barrier in disorders of the skin*. Microsc.Res.Tech., 38(4):361–372.
- [FELDER 1995]
C. C. FELDER (1995). *Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors*. FASEB J., 9(8):619–625.
- [FLORES et al. 1992]
C. M. FLORES, S. W. ROGERS, L. A. PABREZA, B. B. WOLFE und K. J. KELLAR (1992). *A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment*. Mol.Pharmacol., 41(1):31–37.
- [FRANCES 1998]
C. FRANCES (1998). *Smoker's wrinkles: epidemiological and pathogenic considerations*. Clin.Dermatol., 16(5):565–570.

- [FRICK und SEALS 1994]
W. G. FRICK und JR. SEALS, R. R. (1994). *Smoking and wound healing: a review*. Tex.Dent.J., 111(6):21–23.
- [FRITSCH 1993]
P. FRITSCH; D. DRENCKHAHN (Hrsg.) und W. ZENKER (Hrsg.) (1993). *Haut*. In: Benninghoff, *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, Bd. 2, S. 793–823. Urban & Fischer, München, Wien, Baltimore, 15. Auflage.
- [FUCHS 1990]
E. FUCHS (1990). *Epidermal differentiation: the bare essentials*. J.Cell Biol., 111(6 Pt 2):2807–2814.
- [GDALEVICH et al. 2001]
M. GDALEVICH, D. MIMOUNI, M. DAVID und M. MIMOUNI (2001). *Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review and meta-analysis of prospective studies*. J.Am.Acad.Dermatol., 45(4):520–527.
- [GELMETTI und COLONNA 2004]
C. GELMETTI und C. COLONNA (2004). *The value of SCORAD and beyond. Towards a standardized evaluation of severity?*. Allergy, 59 Suppl 78:61–65.
- [GIROLOMONI und PASTORE 2001]
G. GIROLOMONI und S. PASTORE (2001). *The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis*. J.Am.Acad.Dermatol., 45(1 Suppl):S25–S28.
- [GOTTI und CLEMENTI 2004]
C. GOTTI und F. CLEMENTI (2004). *Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology*. Prog.Neurobiol., 74(6):363–396.
- [GOTTI et al. 1994]
C. GOTTI, M. MORETTI, R. LONGHI, L. BRISCINI, B. BALESTRA und F. CLEMENTI (1994). *Expression of alpha-bungarotoxin receptor subtypes in chick central nervous system during development*. J.Recept.Res., 14(6-8):335–346.
- [GRANDO 1997]
S. A. GRANDO (1997). *Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors*. J.Investig.Dermatol.Symp.Proc., 2(1):41–48.
- [GRANDO et al. 1995a]
S. A. GRANDO, R. M. HORTON, E. F. PEREIRA, B. M. ETHELM OKITA, P. M. GEORGE, E. X. ALBUQUERQUE und B. M. CONTI-FINE (1995a). *A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes*. J.Invest Dermatol., 105(6):774–781.
- [GRANDO et al. 1993]
S. A. GRANDO, D. A. KIST, M. QI und M. V. DAHL (1993). *Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine*. J.Invest Dermatol., 101(1):32–36.
- [GRANDO et al. 2006]
S. A. GRANDO, M. R. PITTELKOW und K. U. SCHALLREUTER (2006). *Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance*. J.Invest.Dermatol., 126(9):1948–1965.
- [GRANDO et al. 1995b]
S. A. GRANDO, B. D. ZELICKSON, D. A. KIST, D. WEINSHENKER, P. L. BIGLIARDI, G. WENDELSCHAFER-CRABB, W. R. KENNEDY und M. V. DAHL (1995b). *Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization*. J.Invest Dermatol., 104(1):95–100.

- [GREENSPAN und LAMOTTE 1993]
J. D. GREENSPAN und R. H. LAMOTTE (1993). *Cutaneous mechanoreceptors of the hand: experimental studies and their implications for clinical testing of tactile sensation*. J.Hand Ther., 6(2):75–82.
- [GRINNELL 1994]
F. GRINNELL (1994). *Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction*. J.Cell Biol., 124(4):401–404.
- [GROOT-KORMELINK et al. 1998]
P. J. GROOT-KORMELINK, W. H. LUYTEN, D. COLQUHOUN und L. G. SIVILOTTI (1998). *A reporter mutation approach shows incorporation of the orphan β subunit beta3 into a functional nicotinic receptor*. J.Biol.Chem., 273(25):15317–15320.
- [GROSMAN et al. 1995]
D. D. GROSMAN, M. V. LORENZI, A. C. TRINIDAD und W. L. STRAUSS (1995). *The human choline acetyltransferase gene encodes two proteins*. J.Neurochem., 65(2):484–491.
- [GRUBE und WEBER 1980]
D. GRUBE und E. WEBER (1980). *[Immunocytochemical characterization of enteric hormones (author's transl)]*. Acta Histochem.Suppl, 22:231–240.
- [GUEORGUIEV et al. 1999]
V. D. GUEORGUIEV, R. J. ZEMAN, B. HIEMAGALUR, A. MENEZES und E. L. SABBAN (1999). *Differing temporal roles of Ca²⁺ and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA*. Am.J.Physiol., 276(1 Pt 1):C54–C65.
- [GUPTA et al. 1989]
M. A. GUPTA, A. K. GUPTA, S. KIRKBY, N. J. SCHORK, S. K. GORR, C. N. ELLIS und J. J. VOORHEES (1989). *A psychocutaneous profile of psoriasis patients who are stress reactors. A study of 127 patients*. Gen.Hosp.Psychiatry, 11(3):166–173.
- [HABERBERGER und BODENBENNER 2000]
R. V. HABERBERGER und M. BODENBENNER (2000). *Immunohistochemical localization of muscarinic receptors (M2) in the rat skin*. Cell Tissue Res., 300(3):389–396.
- [HABERBERGER et al. 2002]
R. V. HABERBERGER, U. PFEIL, K. S. LIPS und W. KUMMER (2002). *Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin*. J.Invest Dermatol., 119(4):943–948.
- [HANIFIN 1986]
J. M. HANIFIN (1986). *Pharmacophysiology of atopic dermatitis*. Clin.Rev.Allergy, 4(1):43–65.
- [HARTSCHUH et al. 1986]
W. HARTSCHUH, E. WEIHE und M. REINECKE; J. BEREITER-HAHN (Hrsg.), A. G. MATOLTSY (Hrsg.) und K. S. RICHARDS (Hrsg.) (1986). *Biology of the Integument*, Bd. 5. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage.
- [HEYER et al. 1997]
G. HEYER, M. VOGELGSANG und O. P. HORNSTEIN (1997). *Acetylcholine is an inducer of itching in patients with atopic eczema*. J.Dermatol., 24(10):621–625.
- [HÖGER 2005]
P. HÖGER; PROF. DR. MED. PETER HÖGER (Hrsg.) (2005). *Struktur und Funktion der Haut*. In: *Kinderdermatologie*, Bd. 1, S. 2–15. Schattauer, Stuttgart, New York, 1. Auflage.

- [ISRAEL et al. 1997]
M. ISRAEL, B. LESBATS, M. TOMASI, P. O. COURAUD, L. VIGNAIS, J. QUINONERO und J. L. TCHELINGERIAN (1997). *Calcium-dependent release specificities of various cell lines loaded with different transmitters*. *Neuropharmacology*, 36(11-12):1789–1793.
- [IZUMI und KARITA 1992]
H. IZUMI und K. KARITA (1992). *Axon reflex flare evoked by nicotine in human skin*. *Jpn.J.Physiol.*, 42(5):721–730.
- [JACOBI et al. 2002]
J. JACOBI, J. J. JANG, U. SUNDRAM, H. DAYOUB, L. F. FAJARDO und J. P. COOKE (2002). *Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice*. *Am.J.Pathol.*, 161(1):97–104.
- [JUNG und MOLL 2003]
E. G. JUNG und I. MOLL; E. G. JUNG (Hrsg.) und I. MOLL (Hrsg.) (2003). *Unsere dynamische Haut*. In: *Dermatologie*, Bd. 1, S. 1–14. Thieme-Verlag, Stuttgart, 5. Auflage.
- [KALLIOMAKI et al. 1999]
M. KALLIOMAKI, A. OUWEHAND, H. ARVILOMMI, P. KERO und E. ISOLAURI (1999). *Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age*. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 104(6):1251–1257.
- [KALLIOMAKI et al. 2001]
M. KALLIOMAKI, S. SALMINEN, H. ARVILOMMI, P. KERO, P. KOSKINEN und E. ISOLAURI (2001). *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 357(9262):1076–1079.
- [KALLIOMAKI et al. 2003]
M. KALLIOMAKI, S. SALMINEN, T. POUSSA, H. ARVILOMMI und E. ISOLAURI (2003). *Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 361(9372):1869–1871.
- [KAUFMAN et al. 1988]
H. KAUFMAN, C. VADASZ und A. LAJTHA (1988). *Effects of estradiol and dexamethasone on choline acetyltransferase activity in various rat brain regions*. *Brain Res.*, 453(1-2):389–392.
- [KAWASHIMA und FUJII 2003]
K. KAWASHIMA und T. FUJII (2003). *The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity*. *Life Sci.*, 74(6):675–696.
- [KEYSER et al. 1993]
K. T. KEYSER, L. R. BRITTO, R. SCHOEPPFER, P. WHITING, J. COOPER, W. CONROY, A. BROZOZOWSKA-PRECHTL, H. J. KARTEN und J. LINDSTROM (1993). *Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina*. *J.Neurosci.*, 13(2):442–454.
- [KHIROUG et al. 2002]
S. S. KHIROUG, P. C. HARKNESS, P. W. LAMB, S. N. SUDWEEKS, L. KHIROUG, N. S. MILLAR und J. L. YAKEL (2002). *Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels*. *J.Physiol.*, 540(Pt 2):425–434.
- [KIRKPATRICK et al. 2003]
C. J. KIRKPATRICK, F. BITTINGER, K. NOZADZE und I. WESSLER (2003). *Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells*. *Life Sci.*, 72(18-19):2111–2116.

- [KOBORI und MONTAGNA 1975]
T. KOBORI und W. MONTAGNA (1975). *Biology and Disease of the Hair*. Baltimore.
- [KOELLE et al. 1950]
G. B. KOELLE, E. S. KOELLE und D. S. FRIEDENWALD (1950). *The effect of inhibition of specific and non-specific cholinesterase on the motility of the isolated ileum*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 100(2):180–191.
- [KRETSOS und KASTING 2005]
K. KRETSOS und G. B. KASTING (2005). *Dermal capillary clearance: physiology and modeling*. Skin Pharmacol.Physiol., 18(2):55–74.
- [KUCHAR und MURRIN 1978]
M. J. KUCHAR und L. C. MURRIN (1978). *Sodium-dependent, high affinity choline uptake*. J.Neurochem., 30(1):15–21.
- [KUMMER und HABERBERGER 1999]
W. KUMMER und R. HABERBERGER (1999). *Extrinsic and intrinsic cholinergic systems of the vascular wall*. Eur.J.Morphol., 37(4-5):223–226.
- [KURYATOV et al. 2000]
A. KURYATOV, F. OLALE, J. COOPER, C. CHOI und J. LINDSTROM (2000). *Human alpha6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses*. Neuropharmacology, 39(13):2570–2590.
- [KURZEN 2004]
H. KURZEN (2004). *Das extraneuronale cholinerge System der Haut: Grundlagen und klinische Relevanz*. Hautarzt, 55(5):453–459.
- [KURZEN et al. 2004]
H. KURZEN, H. BERGER, C. JAGER, W. HARTSCHUH, H. NAHER, A. GRATCHEV, S. GOERDT und M. DEICHMANN (2004). *Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin*. J.Invest.Dermatol., 123(5):937–949.
- [KWIATKOWSKI et al. 1996]
T. C. KWIATKOWSKI, JR. HANLEY, E. N. und W. K. RAMP (1996). *Cigarette smoking and its orthopedic consequences*. Am.J.Orthop., 25(9):590–597.
- [LAMPE et al. 1983]
M. A. LAMPE, M. L. WILLIAMS und P. M. ELIAS (1983). *Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation*. J.Lipid Res., 24(2):131–140.
- [LANG et al. 2005]
P. M. LANG, R. BURGSTÄHLER, R. V. HABERBERGER, W. SIPPPEL und P. GRAFE (2005). *A conus peptide blocks nicotinic receptors of unmyelinated axons in human nerves*. Neuroreport, 16(5):479–483.
- [LANG et al. 2003]
P. M. LANG, R. BURGSTÄHLER, W. SIPPPEL, D. IRNICH, B. SCHLOTTER-WEIGEL und P. GRAFE (2003). *Characterization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the membrane of unmyelinated human C-fiber axons by in vitro studies*. J.Neurophysiol., 90(5):3295–3303.
- [LENOVERE et al. 2002]
N. LENOVERE, P. J. CORRINGER und J. P. CHANGEUX (2002). *The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences*. J.Neurobiol., 53(4):447–456.

- [LEOW und MAIBACH 1998]
Y. H. LEOW und H. I. MAIBACH (1998). *Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen*. Clin.Dermatol., 16(5):579–584.
- [LEUNG 2000]
D. Y. LEUNG (2000). *Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention*. J.Allergy Clin.Immunol., 105(5):860–876.
- [LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990]
W. F. LEVER und G. SCHAUMBURG-LEVER (1990). *Histopathology of the Skin*. J.B. Lippincott, Philadelphia, Toronto, 7. Auflage.
- [LIND et al. 2001]
R. J. LIND, D. J. HARDICK, I. S. BLAGBROUGH, B. V. POTTER, A. J. WOLSTENHOLME, A. R. DAVIES, M. S. CLOUGH, F. G. EARLEY, S. E. REYNOLDS und S. WONNACOTT (2001). *[3H]-Methyllycaconitine: a high affinity radioligand that labels invertebrate nicotinic acetylcholine receptors*. Insect Biochem.Mol.Biol., 31(6-7):533–542.
- [LINDSTROM 1995]
J. LINDSTROM; A. NORTH (Hrsg.) (1995). *Nicotinic acetylcholine receptors*. In: *Handbook of Receptors*, S. 153–175. CRC Press.
- [LINDSTROM 1996]
J. LINDSTROM (1996). *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Ion Channels, 4:377–450.
- [LINDSTROM 2000]
J. LINDSTROM; F. CLEMENTI (Hrsg.), D. FORNASARI (Hrsg.) und C. GOTTI (Hrsg.) (2000). *Structure of neuronal nicotinic receptors*. In: *Handbook of Experimental Pharmacology Vol. Neuronal Nicotinic Receptors*, S. 101–162. Springer Verlag, Berlin.
- [LINDSTROM 2003]
J. M. LINDSTROM (2003). *Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology*. Ann.N.Y.Acad.Sci., 998:41–52.
- [LIPS et al. 2003]
K. S. LIPS, U. PFEIL, K. REINERS, C. RIMASCH, K. KUCHELMEISTER, R. C. BRAUN-DULLAEUS, R. V. HABERBERGER, R. SCHMIDT und W. KUMMER (2003). *Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries*. J.Histochem.Cytochem., 51(12):1645–1654.
- [LIPS et al. 2005]
K. S. LIPS, C. VOLK, B. M. SCHMITT, U. PFEIL, P. ARNDT, D. MISKA, L. ERMERT, W. KUMMER und H. KOEPESELL (2005). *Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium*. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 33(1):79–88.
- [LONGMORE et al. 1985]
J. LONGMORE, C. M. BRADSHAW und E. SZABADI (1985). *Effects of locally and systemically administered cholinergic antagonists on the secretory response of human eccrine sweat glands to carbachol*. Br.J.Clin.Pharmacol., 20(1):1–7.
- [LOOMIS 2001]
C. A. LOOMIS (2001). *Development and morphogenesis of the skin*. Adv.Dermatol., 17:183–210.

- [LUKAS et al. 1999]
R. J. LUKAS, J. P. CHANGEUX, N. N. LE, E. X. ALBUQUERQUE, D. J. BALFOUR, D. K. BERG, D. BERTRAND, V. A. CHIAPPINELLI, P. B. CLARKE, A. C. COLLINS, J. A. DANI, S. R. GRADY, K. J. KELLAR, J. M. LINDSTROM, M. J. MARKS, M. QUIK, P. W. TAYLOR und S. WONNACOTT (1999). *International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits*. Pharmacol.Rev., 51(2):397–401.
- [LUND et al. 1997]
C. H. LUND, L. B. NONATO, J. M. KULLER, L. S. FRANCK, C. CULLANDER und D. J. DURAND (1997). *Disruption of barrier function in neonatal skin associated with adhesive removal*. J.Pediatr., 131(3):367–372.
- [MARQUARDT et al. 1982]
D. L. MARQUARDT, H. J. MOTULSKY und S. I. WASSERMAN (1982). *Rat lung cholinergic receptor: characterization and regulation by corticosteroids*. J.Appl.Physiol., 53(3):731–736.
- [MATOLTSY et al. 1986]
A. G. MATOLTSY, K. JIMBOW, T. B. FITZPATRICK, W. C. QUEVEDO, R. E. CHAPMAN, M. BELL, K. HASHIMOTO, K. HORI, M. ASO und W. B. QUAY; J. BEREITER-HAHN (Hrsg.) und A. G. MATOLTSY (Hrsg.) (1986). *The skin of mammals*. In: *Biology of the Integument*, S. 255–373. Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage.
- [MCGEHEE und ROLE 1995]
D. S. MCGEHEE und L. W. ROLE (1995). *Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons*. Annu.Rev.Physiol., 57:521–546.
- [MILLAR 2003]
N. S. MILLAR (2003). *Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem.Soc.Trans., 31(Pt 4):869–874.
- [MISERY 2004]
L. MISERY (2004). *Nicotine effects on skin: are they positive or negative?*. Exp.Dermatol., 13(11):665–670.
- [MONTAGNA und PARAKKAL 1974]
W. MONTAGNA und P. F. PARAKKAL (1974). *The Structure and Fuction of Skin*. Academic Press, New York, 3. Auflage.
- [MUNGER und IDE 1988]
B. L. MUNGER und C. IDE (1988). *The structure and function of cutaneous sensory receptors*. Arch.Histol.Cytol., 51(1):1–34.
- [NEZU et al. 1992]
J. NEZU, K. MOTOJIMA, H. TAMURA und S. OHKUMA (1992). *Molecular cloning of a rat liver cDNA encoding the 16 kDa subunit of vacuolar H(+)-ATPases: organellar and tissue distribution of 16 kDa proteolipids*. J.Biochem.(Tokyo), 112(2):212–219.
- [NGUYEN et al. 2001]
V. A. NGUYEN, C. FURHAPTER und N. SEPP (2001). *Upregulation of MHC class I molecules on human dermal microvascular endothelial cells by interferon alpha*. Microvasc.Res., 62(2):204–207.
- [NGUYEN et al. 2003]
V. T. NGUYEN, J. ARREDONDO, A. I. CHERNYAVSKY, Y. KITAJIMA und S. A. GRANDO (2003). *Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion*. Life Sci., 72(18-19):2081–2085.

- [NGUYEN et al. 2004]
V. T. NGUYEN, A. I. CHERNYAVSKY, J. ARREDONDO, D. BERCOVICH, A. ORR-URTREGER, D. E. VETTER, J. WESS, A. L. BEAUDET, Y. KITAJIMA und S. A. GRANDO (2004). *Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. Exp.Cell Res., 294(2):534–549.
- [NGUYEN et al. 2000]
V. T. NGUYEN, A. NDOYE und S. A. GRANDO (2000). *Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine*. J.Biol.Chem., 275(38):29466–29476.
- [NOSE et al. 1990]
A. NOSE, K. TSUJI und M. TAKEICHI (1990). *Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules*. Cell, 61(1):147–155.
- [NOVAK und BIEBER 2004]
N. NOVAK und T. BIEBER (2004). *Pathophysiologie der atopischen Dermatitis*. Deutsches /Ärzteblatt., Jg.101,Heft 3:92–100.
- [NOVAK et al. 2005]
N. NOVAK, B. KWIEK und T. BIEBER (2005). *The mode of topical immunomodulators in the immunological network of atopic dermatitis*. Clin.Exp.Dermatol., 30(2):160–164.
- [OKUDA und HAGA 2000]
T. OKUDA und T. HAGA (2000). *Functional characterization of the human high-affinity choline transporter*. FEBS Lett., 484(2):92–97.
- [OLSZEWSKI 2003]
W. L. OLSZEWSKI (2003). *The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions*. Lymphat.Res.Biol., 1(1):11–21.
- [OLYMPUS 2005]
OLYMPUS (2005). *Laser Scanning Confocal Microscopy*. <http://www.olympusfluoview.com/theory/index.html>.
- [PALMA et al. 1999]
E. PALMA, L. MAGGI, B. BARABINO, F. EUSEBI und M. BALLIVET (1999). *Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits*. J.Biol.Chem., 274(26):18335–18340.
- [PAPKE et al. 1993]
R. L. PAPKE, R. M. DUVOISIN und S. F. HEINEMANN (1993). *The amino terminal half of the nicotinic beta-subunit extracellular domain regulates the kinetics of inhibition by neuronal bungarotoxin*. Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci., 252(1334):141–148.
- [PASTORE et al. 1997]
S. PASTORE, E. FANALES-BELASIO, C. ALBANESI, L. M. CHINNI, A. GIANNETTI und G. GIROLOMONI (1997). *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin*. J.Clin.Invest., 99(12):3009–3017.
- [PATELLA et al. 1995]
V. PATELLA, I. MARINO, B. LAMPARTER, E. ARBUSTINI, M. ADT und G. MARONE (1995). *Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization*. J.Immunol., 154(6):2855–2865.

- [PENG et al. 2004]
H. PENG, R. L. FERRIS, T. MATTHEWS, H. HIEL, A. LOPEZ-ALBAITERO und L. R. LUSTIG (2004). *Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes*. Life Sci., 76(3):263–280.
- [PERCHELLET et al. 1982]
J. P. PERCHELLET, G. S. KISHORE, E. A. CONRAD und R. K. BOUTWELL (1982). *Effects of cell surface receptor-altering agents on the binding and biological activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in isolated epidermal cells*. Carcinogenesis, 3(10):1149–1158.
- [PETSCHKE et al. 2006]
F. T. PETSCHKE, T. O. ENGELHARDT, H. ULMER und H. PIZA-KATZER (2006). *[Effect of cigarette smoking on skin perfusion of the hand]*. Chirurg, 77(11):1022–1026.
- [PFEIL et al. 2003]
U. PFEIL, R. V. HABERBERGER, K. S. LIPS, L. EBERLING, V. GRAU und W. KUMMER (2003). *Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia*. Life Sci., 72(18-19):2087–2090.
- [PINKUS und MEHREGAN 1976]
H. PINKUS und A. H. MEHREGAN (1976). *A Guide to Dermatohistopathology*. Appleton-Century-Croft, New York, 2. Auflage.
- [PUCCI et al. 2005]
N. PUCCI, E. NOVEMBRE, M. G. CAMMARATA, R. BERNARDINI, M. G. MONACO, C. CALOGERO und A. VIERUCCI (2005). *Scoring atopic dermatitis in infants and young children: distinctive features of the SCORAD index*. Allergy, 60(1):113–116.
- [RAFTERY et al. 1980]
M. A. RAFTERY, M. W. HUNKAPILLER, C. D. STRADER und L. E. HOOD (1980). *Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits*. Science, 208(4451):1454–1456.
- [RAJKA 1986]
G. RAJKA (1986). *Natural history and clinical manifestations of atopic dermatitis*. Clin.Rev.Allergy, 4(1):3–26.
- [RAMIREZ-LATORRE et al. 1996]
J. RAMIREZ-LATORRE, C. R. YU, X. QU, F. PERIN, A. KARLIN und L. ROLE (1996). *Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels*. Nature, 380(6572):347–351.
- [RATHOUZ und BERG 1994]
M. M. RATHOUZ und D. K. BERG (1994). *Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms*. J.Neurosci., 14(11 Pt 2):6935–6945.
- [REINHEIMER et al. 1998]
T. REINHEIMER, M. MUNCH, F. BITTINGER, K. RACKE, C. J. KIRKPATRICK und I. WESSLER (1998). *Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans*. Eur.J.Pharmacol., 349(2-3):277–284.
- [REZNIK 1996]
M. REZNIK (1996). *[Structure and functions of the cutaneous nervous system]*. Pathol.Biol.(Paris), 44(10):831–837.

- [ROSSIER et al. 1977]
J. ROSSIER, Y. SPANTIDAKIS und P. BENDA (1977). *The effect of Cl⁻ on choline acetyltransferase kinetic parameters and a proposed role for Cl⁻ in the regulation of acetylcholine synthesis*. J.Neurochem., 29(6):1007–1012.
- [RUOCCO et al. 2002]
I. RUOCCO, A. C. CUELLO, A. PARENT und A. RIBEIRO-DA SILVA (2002). *Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers*. J.Comp Neurol., 448(4):323–336.
- [RYAN 1973]
T. J. RYAN; A. JARRET (Hrsg.) (1973). *Structure, pattern and shape of the blood vessels of the skin*. In: *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*, S. 577. Academic Press, New York.
- [RYAN 1983]
T. J. RYAN; L. A. GOLDSMITH (Hrsg.) (1983). *Cutaneous circulation*. In: *Biochemistry and Physiology of the Skin*, S. 817–877. Oxford University Press, New York, London.
- [SARGENT 1993]
P. B. SARGENT (1993). *The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Annu.Rev.Neurosci., 16:403–443.
- [SCHÄFER 2000]
T. SCHÄFER; PROF. DR. MED. B. PRZYBILLA (Hrsg.) und K.-C. BERGMANN (Hrsg.) (2000). *Erfassung der atopischen Diathese*. In: *Praktisch allergische Diagnostik*, S. 340–350. Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- [SCHAFFER et al. 2001]
T. SCHAFFER, E. BOHLER, S. RUHDORFER, L. WEIGL, D. WESSNER, B. FILIPIAK, H. E. WICHMANN und J. RING (2001). *Epidemiology of contact allergy in adults*. Allergy, 56(12):1192–1196.
- [SCHAFFER et al. 1999]
T. SCHAFFER, U. KRAMER, D. DOCKERY, D. VIELUF, H. BEHRENDT und J. RING (1999). *What makes a child allergic? Analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from East and West Germany*. Allergy Asthma Proc., 20(1):23–27.
- [SCHALLREUTER 1997]
K. U. SCHALLREUTER (1997). *Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis*. J.Investig.Dermatol.Symp.Proc., 2(1):37–40.
- [SCHIEBLER et al. 1997]
T. H. SCHIEBLER, W. SCHMIDT und K. ZILLES (1997). *Haut und Hautanhangsorgane*. In: *Anatomie*, Bd. 1, S. 205–218. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 7. Auflage.
- [SCHOETZAU et al. 2002]
A. SCHOETZAU, B. FILIPIAK-PITTOFF, K. FRANKE, S. KOLETZKO, B. A. VON, A. GRUEBL, C. P. BAUER, D. BERDEL, D. REINHARDT und H. E. WICHMANN (2002). *Effect of exclusive breast-feeding and early solid food avoidance on the incidence of atopic dermatitis in high-risk infants at 1 year of age*. Pediatr.Allergy Immunol., 13(4):234–242.
- [SCHWARTZ und KELLAR 1985]
R. SCHWARTZ und K. J. KELLAR (1985). *In vivo regulation of [³H] acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic drugs*. J.Neurochem., 45:427–433.

- [SCOTT 1962]
A. SCOTT (1962). *Acetylcholine in normal and diseased skin*. Br.J.Dermatol., 74:317–322.
- [SEGUELA et al. 1993]
P. SEGUELA, J. WADICHE, K. NELEY MILLER, J. A. DANI und J. W. PATRICK (1993). *Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium*. J.Neurosci., 13(2):596–604.
- [SGARD et al. 2002]
F. SGARD, E. CHARPANTIER, S. BERTRAND, N. WALKER, D. CAPUT, D. GRAHAM, D. BERTRAND und F. BESNARD (2002). *A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit*. Mol.Pharmacol., 61(1):150–159.
- [SILVERSTEIN 1992]
P. SILVERSTEIN (1992). *Smoking and wound healing*. Am.J.Med, 93(1A):22S–24S.
- [SMITH 1992]
E. A. SMITH (1992). *Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma*. Curr.Opin.Rheumatol., 4(6):869–877.
- [SOUMELIS et al. 2002]
V. SOUMELIS, P. A. RECHE, H. KANZLER, W. YUAN, G. EDWARD, B. HOMEY, M. GILLET, S. HO, S. ANTONENKO, A. LAUERMA, K. SMITH, D. GORMAN, S. ZURAWSKI, J. ABRAMS, S. MENON, T. MCCLANAHAN, R. R. DE WAAL-MALEFYT, F. BAZAN, R. A. KASTELEIN und Y. J. LIU (2002). *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat.Immunol., 3(7):673–680.
- [SPANOS et al. 1996]
C. SPANOS, M. EL MANSOURY, R. LETOURNEAU, P. MINOGIANNIS, J. GREENWOOD, P. SIRI, G. R. SANT und T. C. THEOHARIDES (1996). *Carbachol-induced bladder mast cell activation: augmentation by estradiol and implications for interstitial cystitis*. Urology, 48(5):809–816.
- [SPRAY 1986]
D. C. SPRAY (1986). *Cutaneous temperature receptors*. Annu.Rev.Physiol., 48:625–638.
- [STUBBS et al. 2000]
M. C. STUBBS, I. MIN, M. W. IZZO, R. RALLAPALLI, A. DERFOUL und D. J. HALL (2000). *The ZF87/MAZ transcription factor functions as a growth suppressor in fibroblasts*. Biochem.Cell Biol., 78(4):477–485.
- [TAYLOR et al. 1994]
J. L. TAYLOR, R. T. MAYER und C. M. HIMEL (1994). *Conformers of acetylcholinesterase: a mechanism of allosteric control*. Mol.Pharmacol., 45(1):74–83.
- [TSAI et al. 2005]
M. TSAI, M. A. GRIMBALDESTON, M. YU, S. Y. TAM und S. J. GALLI (2005). *Using mast cell knock-in mice to analyze the roles of mast cells in allergic responses in vivo*. Chem.Immunol.Allergy, 87:179–197.
- [TUCEK 1982]
S. TUCEK (1982). *The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat*. J.Physiol, 322:53–69.

- [USUKI et al. 1998]
K. USUKI, T. KANEKURA, K. ARADONO und T. KANZAKI (1998). *Effects of nicotine on peripheral cutaneous blood flow and skin temperature*. J.Dermatol.Sci., 16(3):173–181.
- [VEGA et al. 1996]
J. A. VEGA, J. J. HARO und M. E. DEL VALLE (1996). *Immunohistochemistry of human cutaneous Meissner and pacinian corpuscles*. Microsc.Res.Tech., 34(4):351–361.
- [VERBITSKY et al. 2000]
M. VERBITSKY, C. V. ROTHLIN, E. KATZ und A. B. ELGOYHEN (2000). *Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor*. Neuropharmacology, 39(13):2515–2524.
- [WALDEYER 1969]
A. WALDEYER; A. WALDEYER (Hrsg.) (1969). *Die Haut und ihre Anhangsgebilde*. In: *Anatomie des Menschen*, Bd. 6, S. 91–96. De Gruyter, Berlin, 6. Auflage.
- [WANG et al. 1996]
Z. Z. WANG, S. F. HARDY und Z. W. HALL (1996). *Assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. The first transmembrane domains of truncated alpha and delta subunits are required for heterodimer formation in vivo*. J.Biol.Chem., 271(44):27575–27584.
- [WARNER et al. 2004]
D. O. WARNER, M. J. JOYNER und N. CHARKOUDIAN (2004). *Nicotine increases initial blood flow responses to local heating of human non-glabrous skin*. J.Physiol, 559(Pt 3):975–984.
- [WESS 1996]
J. WESS (1996). *Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors*. Crit Rev.Neurobiol., 10(1):69–99.
- [WESSLER et al. 1998]
I. WESSLER, C. J. KIRKPATRICK und K. RACKE (1998). *Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans*. Pharmacol.Ther., 77(1):59–79.
- [WESSLER et al. 1999]
I. WESSLER, C. J. KIRKPATRICK und K. RACKE (1999). *The cholinergic 'pit-fall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans*. Clin.Exp.Pharmacol.Physiol., 26(3):198–205.
- [WESSLER und KIRKPATRICK 2001]
I. K. WESSLER und C. J. KIRKPATRICK (2001). *The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways*. Pulm.Pharmacol.Ther., 14(6):423–434.
- [WHITING und LINDSTROM 1988]
P. J. WHITING und J. M. LINDSTROM (1988). *Characterization of bovine and human neuronal nicotinic acetylcholine receptors using monoclonal antibodies*. J.Neurosci., 8(9):3395–3404.
- [WILLS-KARP et al. 2001]
M. WILLS-KARP, J. SANTELIZ und C. L. KARP (2001). *The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis*. Nat.Rev.Immunol., 1(1):69–75.
- [WONNACOTT 1990]
S. WONNACOTT (1990). *The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine*. Trends Pharmacol.Sci., 11(6):216–219.

- [WONNACOTT 1997]
S. WONNACOTT (1997). *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. Trends Neurosci., 20(2):92–98.
- [WRIGHT et al. 1983]
W. E. WRIGHT, J. M. PETERS und T. M. MACK (1983). *Organic chemicals and malignant melanoma*. Am.J.Ind.Med., 4(4):577–581.
- [WÜTHRICH 1984]
B. WÜTHRICH (1984). *[Immunopathology of atopic dermatitis]*. Monatsschr.Kinderheilkd., 132(6):426–431.
- [WÜTHRICH 1989]
B. WÜTHRICH (1989). *Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens*. Dermatologica, 178(1):51–53.
- [WÜTHRICH et al. 1983]
B. WÜTHRICH, A. BENZ und F. SKVARIL (1983). *IgE and IgG4 levels in children with atopic dermatitis*. Dermatologica, 166(5):229–235.
- [YIN et al. 2000]
L. YIN, A. MORITA und T. TSUJI (2000). *Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract*. Arch.Dermatol.Res., 292(4):188–194.
- [YIN et al. 2001]
L. YIN, A. MORITA und T. TSUJI (2001). *Skin premature aging induced by tobacco smoking: the objective evidence of skin replica analysis*. J.Dermatol.Sci., 27 Suppl 1:S26–S31.
- [YU und ROLE 1998]
C. R. YU und L. W. ROLE (1998). *Functional contribution of the alpha5 subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones*. J.Physiol., 509 (Pt 3):667–681.
- [ZIA et al. 2000]
S. ZIA, A. NDOYE, T. X. LEE, R. J. WEBBER und S. A. GRANDO (2000). *Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 293(3):973–981.
- [ZOUBOULIS 2000]
C. C. ZOUBOULIS (2000). *Human skin: an independent peripheral endocrine organ*. Horm.Res., 54(5-6):230–242.

Anhang A.

Fragebogen

Fragebogen für Neurodermitis-Patienten²

Datum der Untersuchung: _____ 2004 **Codierung:** _____

Alter: _____ Jahre; **Geschlecht:** ☐ weiblich ☐ männlich

Familienstand: ☐ ledig ☐ verheiratet ☐ geschieden oder getrennt lebend
☐ unverheiratet, aber mit Partner/in zusammen lebend

☐ Eigene **Kinder:** ____ (Anzahl); falls ja, Alter der Kinder: _____ Jahre
☐ andere Kinder, die im Haushalt leben³: ____ (Anz.), ggf. Alter der Kinder: _____
☐ keine Kinder

Derzeit ausgeübter **Beruf:** _____

falls abweichend davon, erlernter Beruf: _____

Höchster **Schulabschluss:**

☐ kein ☐ Hauptschule ☐ Realschule ☐ Fachhochschulreife
☐ allgemeine Hochschulreife ☐ Fachhochschulabschluss ☐ Hochschulabschluss
☐ andere, welche: _____

Sind Sie **Raucher/in**?

☐ Nein ☐ Ja Wenn ja, wie viele Zigaretten täglich: _____ Stück
☐ Ex-Raucher Seit: _____ Jahr(en)

Entnahmestelle betroffene Haut: ☐ linke Ellenbeuge ☐ rechte Ellenbeuge
☐ andere Lokalisation: _____

Entnahmestelle erscheinungsfreie Haut: ☐ linke Ellenbeuge ☐ rechte Ellenbeuge
☐ andere Lokalisation: _____

Seit wann haben Sie Neurodermitis? Seit circa _____ Jahr(en)

Im **Vergleich** mit anderen Phasen meiner Hauterkrankung, ist meine Haut jetzt

-5					0					+5
viel schlechter					unverändert					viel besser

Haben **Sie selbst** noch andere atopische Erkrankungen?

☐ Ja ☐ Nein

² Niemeier V, Kupfer J., Haberberger R, Kindt F, Gieler U. Justus-Liebig-Universität Gießen

³ zum Beispiel Kinder vom Partner/in aus vorheriger Beziehung

3

Wenn ja, welche

- ☐ Asthma bronchiale
☐ Heuschnupfen
☐ Urtikaria (Nesselsucht)
☐ Allergien

Mussten Sie **in den letzten 14 Tagen** wegen einer dieser anderen atopischen Erkrankungen Medikamente anwenden?

- ☐ Ja ☐ Nein

Wenn ja, welche?: _____

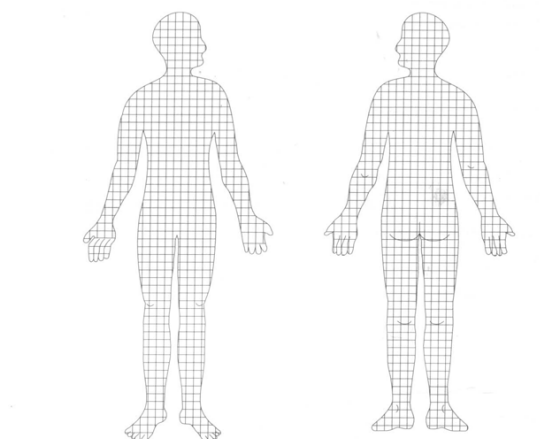
Sind bei Ihnen andere **chronische** Erkrankungen bekannt?

- ☐ ja ☐ nein

wenn ja, welche?: _____

Hauptkriterien zur Diagnose einer Neurodermitis (1-4)

1) Welche **Körperpartien** sind betroffen? (bitte einzelne Felder genau markieren)



2) Ist der **Verlauf chronisch**?⁴

ja ☐ nein ☐

3) Ist **Juckreiz** vorhanden?

ja ☐ nein ☐

4a) Typische Morphe/ **Lokalisation**?⁵

ja ☐ nein ☐

4b) Wie stark ist die **Rötung**?

keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

4c) Wie stark sind die **Ödem-/ Papelbildung**

keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

4d) Wie stark sind **Nässen/ Krustenbildung**?

keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

4e) Wie stark ist die **Lichenifikation**?

keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

4f) Wie stark sind die **Exkorationen**?

keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

4g) Wie stark ist die **Trockenheit**?⁶ der Haut?

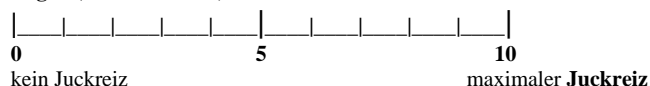
keine ☐ schwach ☐ mittel ☐ stark ☐

⁴ Hautveränderungen mindestens 4 Wochen pro Jahr

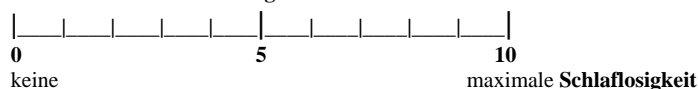
⁵ s. obige Rasterzeichnung

⁶ an nicht betroffenen Arealen

4



Durchschnittliche **Schlaflosigkeit** durch die Neurodermitis **in den letzten 3 Tagen:**



Sind bei Ihnen **Allergien** bekannt? ja ☐ nein ☐
Wenn ja, welche:

Sind Ihnen Testergebnisse von Allergietestungen bekannt? ja ☐ nein ☐

a) **Hauttestungen (Prick):**
Positive Reaktionen auf:

b) Immunglobulin (IgE): _____

c) Testergebnisse von **anderen Testungen** (auch z. B. bekannte Kontaktallergien):

Behandlung der Haut in den letzten 14 Tagen:

☐ Basistherapie ☐ mindestens einmal täglich ☐ bei Bedarf

☐ Kortison (lokal):
wenn ja, welche Wirkstärke: ☐ schwach ☐ mittelstark ☐ stark ☐ sehr stark
Wann zuletzt aufgetragen? ☐ vor mehr als drei Tagen ☐ vor mehr als 2 Wochen

☐ Antihistaminika (Name des Präparates: _____)
wenn ja: wie viele Tabletten in den letzten 2 Wochen?: _____

☐ Lichttherapie (UVB, UVA, PUVA, Balneophototherapie oder andere)
wenn ja, wann zuletzt?: _____

☐ andere Medikamente gegen die Hautveränderungen
wenn ja, welche?: _____

☐ andere Therapien ausprobiert (z. B. Phytotherapie, Homöopathie etc.)
wenn ja, welche?:

☐ Einnahme von Medikamenten gegen andere Erkrankungen in den letzten 14 Tagen
wenn ja, welche: _____; wann zuletzt: vor _____ Tagen

5

Familienanamnese:

Geschwister: ☐ nein ☐ ja **wenn ja, wie viele Geschwister?:** ____
 Alter der einzelnen Geschwister: _____ (Jahre)

Sind Neurodermitis oder andere **atopische Erkrankungen** (Asthma bronchiale, Heuschnupfen, Nesselsucht/ Urtikaria oder Allergien) **in der Familie** bekannt?

☐ Ja☐ Nein

Wenn ja, wer ist betroffen? (Bitte zutreffende(s) Feld(er) ankreuzen bzw. rechtes Feld "Allergien" ausschreiben)

	Neuro- dermitis	Asthma bronchiale	Heu- schnupfen	Nesselsucht (Urtikaria)	Allergien	Welche Allergien?
Vater						
Mutter						
Geschwister 1 ⁷						
Geschwister 2						
Geschwister 3						
Großvater (mütterl.)						
Großmutter (mütterl.)						
Großvater (väterl.)						
Großmutter (väterl.)						

Andere chronische Erkrankungen in der **Familie**: _____

Wer ist betroffen?: _____

Meine Hauterkrankung verschlechtert sich unter **Stress** (bitte ankreuzen):

trifft gar nicht zu 0
|
|
|
|
|
 5 trifft voll-
kommen zu

Welche Art von Stress empfinden Sie in Bezug auf Ihre Haut am ungünstigsten
 (Mehrfachnennungen möglich):

- ☐ Beruflicher Stress ☐ Partnerkonflikte ☐ andere familiäre Belastungen
☐ Zeitdruck ☐ Stress hat keinen negativen Einfluß
☐ andere Stressoren: _____ (bitte aufführen)

⁷ *Bei mehr als drei Geschwistern bitte unten Felder entsprechend anfügen

Nebenkriterien nach Hanifin und Rajka⁸

- | | |
|---|---|
| 1. Xerosis | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 2. Ichthyosishand/ palmare Hyperlinearität/ Keratosis pilaris | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 3. Positiver Prick-Test | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 4. Erhöhtes Gesamt-IgE | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 5. Erkrankungsbeginn im frühen Kindesalter | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 6. Neigung zu rezidivierenden Hautinfektionen, z. B.
Staph. aureus oder Herpes simplex | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 7. Rezidivierende Hand- und Fußekzeme | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 8. Ekzeme der Brustwarze | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 9. Cheilitis | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 10. Rezidivierende Konjunktivitis | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 11. Dennie-Morgan-Falte | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 12. Keratoconus | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 13. Anteriore subcapsuläre Katarakt | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 14. Dunkle Pigmentierung der Orbitalregion | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 15. Gesichtserythema | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 16. Pityriasis alba | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 17. Ausgeprägte anteriore Halsfalte | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 18. Verstärkter Juckreiz beim Schwitzen | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 19. Intoleranz gegenüber Wollfasern | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 20. Follikuläre Hyperkeratose | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 21. Weißer Dermographismus | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |
| 22. Einfluss psychischer Faktoren, wie Stress, verschlechtern
das Krankheitsbild | ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> |

Auswertung:**Diagnosekriterien nach Hanifin und Rajka (1980)⁸ erfüllt?**

- ☐ Ja ☐ Nein (Keine Studienteilnahme möglich!)

SCORAD⁹ gesamt: _____ Punkte

Berechnung nach SCORAD-Formel: $A/5 + 7B/2 + C$

(A = Flächenbefall nach „Neunerregel“, B (Rötung; Ödem/Papelbildung; Nässen-/Krustenbildung; Exkoration; Lichenifikation; Trockenheit), C Juckreiz (0-10) und Schlaflosigkeit (0-10))

- ☐ Nur Neurodermitis (keine assoziierten Atemwegserkrankungen)¹⁰
- ☐ Intrinsischer Typ (IgE nicht erhöht, keine Sensibilisierungen gegen Inhalations- oder NM-Allergene)
 - ☐ Extrinsischer Typ (IgE erhöht, bekannte Sensibilisierungen gegen Inhalations- oder NM-Allergene)
- ☐ Gemischter Typ (bekannte Respirationsallergien mit Asthma bronchiale oder Rhinitis)
- ☐ High Stress Responder (VAS ≥ 3)¹¹ ☐ Low Stress Responder (VAS < 3)

⁸ Hanifin JM, Rajka G (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl 92: 44-47.

⁹ European Task Force on Atopic Dermatitis (1993). Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Dermatology 186: 23-31

¹⁰ nach Wüthrich B und Schmid-Grendelmeier P: Definition und Diagnosis of Intrinsic versus Extrinsic Atopic Dermatitis. In Atopic Dermatitis, Eds Bieber T, Leung DYM. New York Basel Dekker Inc 2003, pp1-20

¹¹ nach Gupta MA, Gupta AK, Kirkby S, Schork NJ, Gorr SK, Ellis CN, Voorhees JJ (1989). A psychocutaneous profile of psoriasis patients who are stress reactors. Gen Hosp Psych 11: 166-173

Abbildung A.1.: AD-Fragebogen: die Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Aufnahme der Probanden in die Studie wurden mittels des AD-Fragebogens gestellt. Zusätzlich wurden Fragen zum persönlichen Umfeld, zu Gewohnheiten und zum Krankheitsverlauf der Probanden gestellt, um mögliche Zusammenhänge zu Veränderungen in der Rezeptorexpression zu ermitteln.

Anhang B.

Bildteil

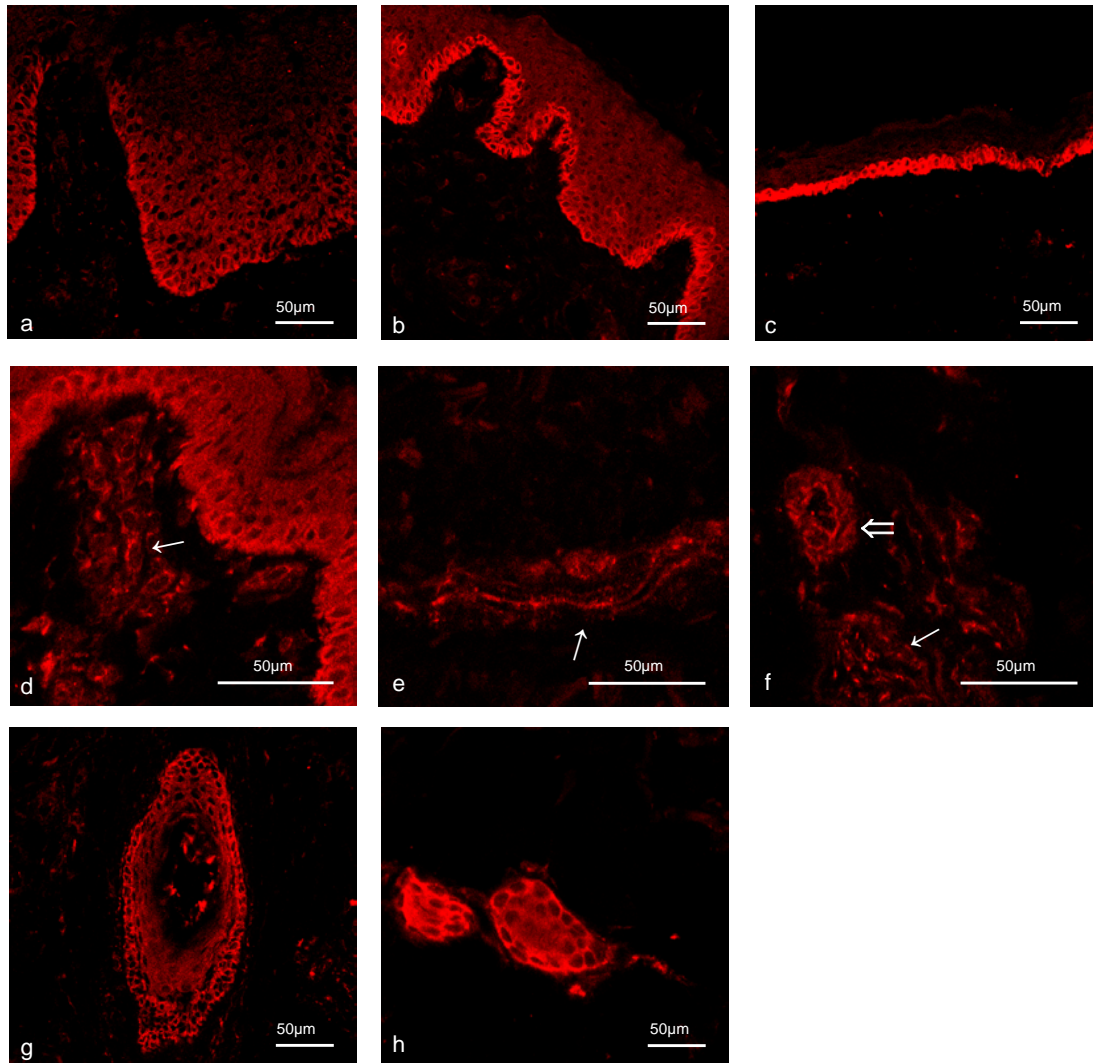


Abbildung B.1.: Lokalisation der nAChR $\alpha 3$ -Untereinheit in humaner Haut: $\alpha 3$ -IR zeigt sich in den Keratinozyten der (a) Epidermis der läsionalen AD-Haut, (b) Epidermis der non-läsionalen AD-Haut und (c) Epidermis der Haut von gesunden Probanden. Zusätzlich konnte sie in den endothelialen Zellen (d) subepidermaler Kapillaren (Pfeil), in (e) Axonen dermalen Nervenfaserbündel (Pfeil), (f) dermalen Arteriolen (Doppelpfeil) und Nervenfaserbündeln (Pfeil), im (g) Haarfollikel und in den (h) Drüsenausführungsgängen ekkriner Drüsen nachgewiesen werden.

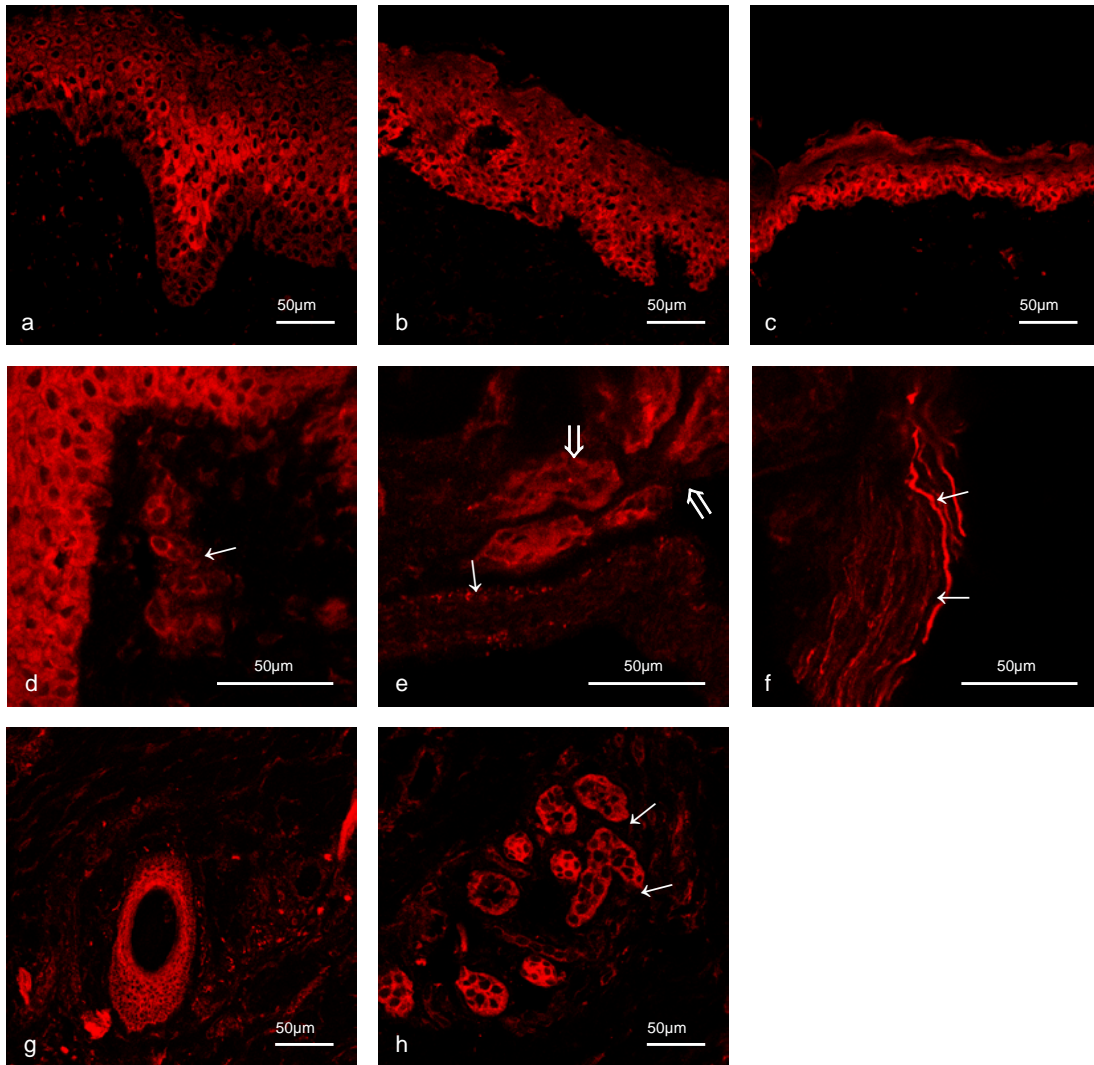


Abbildung B.2.: Lokalisation der nAChR $\alpha 5$ -Untereinheit in humaner Haut: $\alpha 5$ -IR zeigt sich in den Keratinozyten der (a) Epidermis der läsionalen AD-Haut, (b) Epidermis der non-läsionalen AD-Haut und (c) Epidermis der Haut von gesunden Probanden. Zusätzlich konnte sie in den endothelialen Zellen (d) subepidermaler Kapillaren (Pfeil), in (e) Axonen dermalen Nervenfaserbündel (Pfeil), (f) dermalen Arteriolen (Doppelpfeil) und Nervenfaserbündeln (Pfeil), im (g) Haarfollikel und in den (h) Drüsenausführungsgängen ekkriner Drüsen nachgewiesen werden.

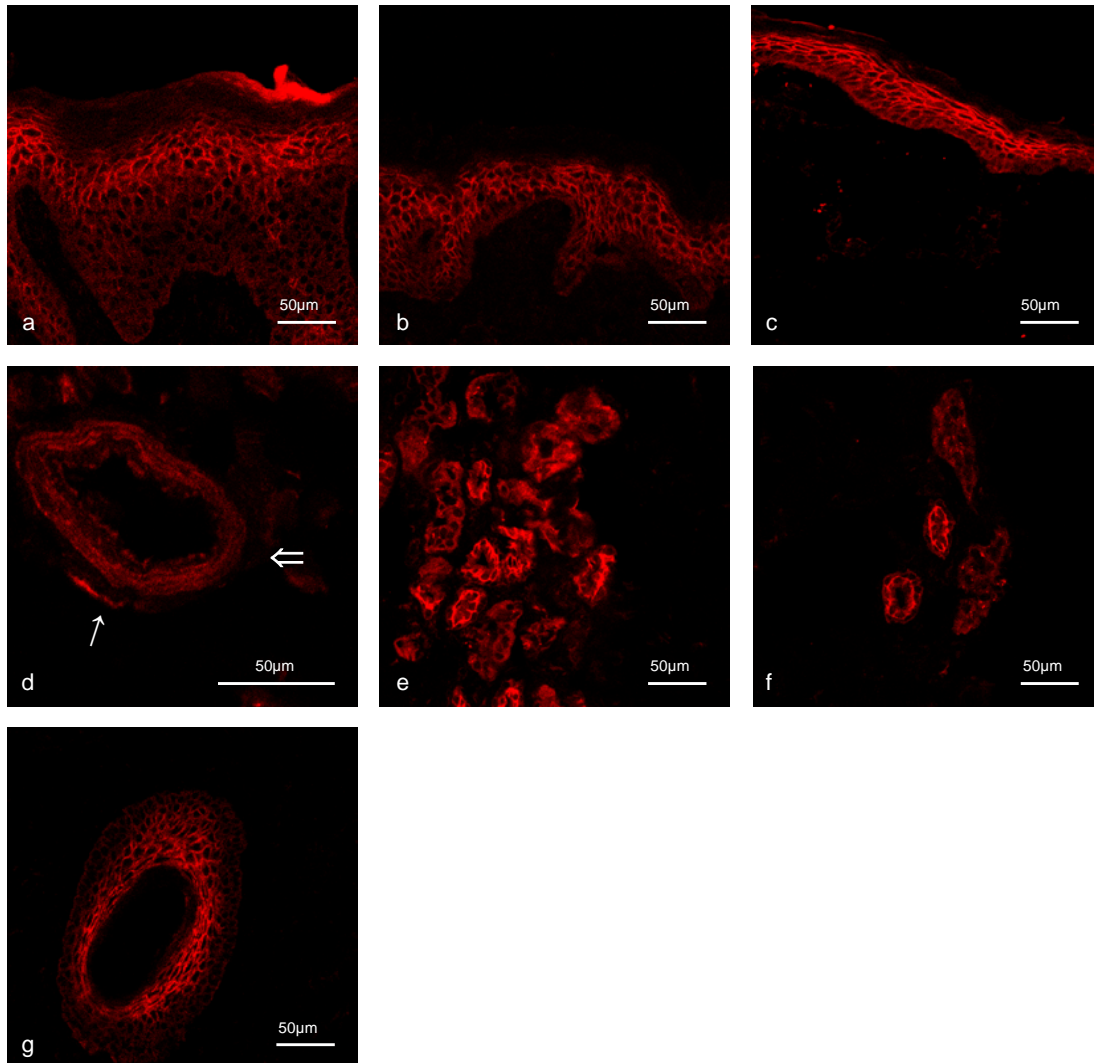


Abbildung B.3.: Lokalisation der nAChR $\alpha 7$ -Untereinheit in humaner Haut: mittels indirekter Immunhistochemie konnte die Lokalisation der $\alpha 7$ -IR in der (a) Epidermis der läsionalen AD-Haut, der (b) Epidermis der non-läsionalen AD-Haut und der (c) Epidermis der Haut gesunder Probanden nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich $\alpha 7$ -IR in (d) dermalen Arteriolen (Doppelpfeil) und Nervenfasern (Pfeil), in den (e) Zellen von Drüsenazini und (f) Drüsenausführungsgängen ekkriner Drüsen sowie in den (g) Haarfollikeln.

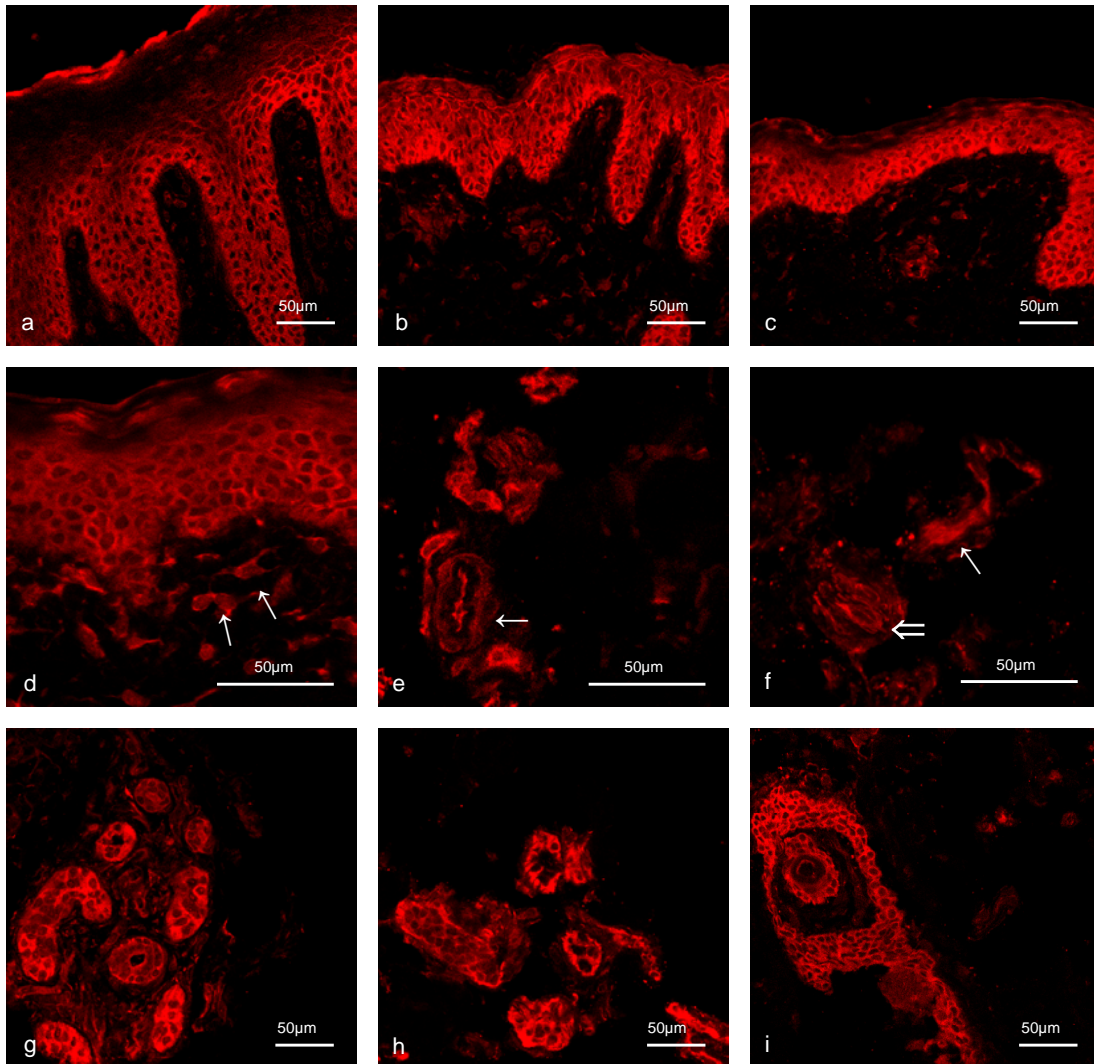


Abbildung B.4.: Lokalisation der nAChR $\alpha 9$ -Untereinheit in humaner Haut: mittels indirekter Immunhistochemie konnte die Lokalisation der $\alpha 9$ -IR in der (a) Epidermis der läSIONalen AD-Haut, der (b) Epidermis der non-läSIONalen AD-Haut und der (c) Epidermis der Haut gesunder Probanden nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich $\alpha 9$ -IR in (d) subepidermalen Fibroblasten (Pfeil), in (e) dermalen Arteriolen (Pfeil), (f) in dermalen Nervenfaserbündeln (Doppelpfeil) und Venolen (Pfeil), in den (g) Drüsenausführungsgängen und (h) – Drüsenazini ekkriner Drüsen sowie in (i) Haarfollikeln.

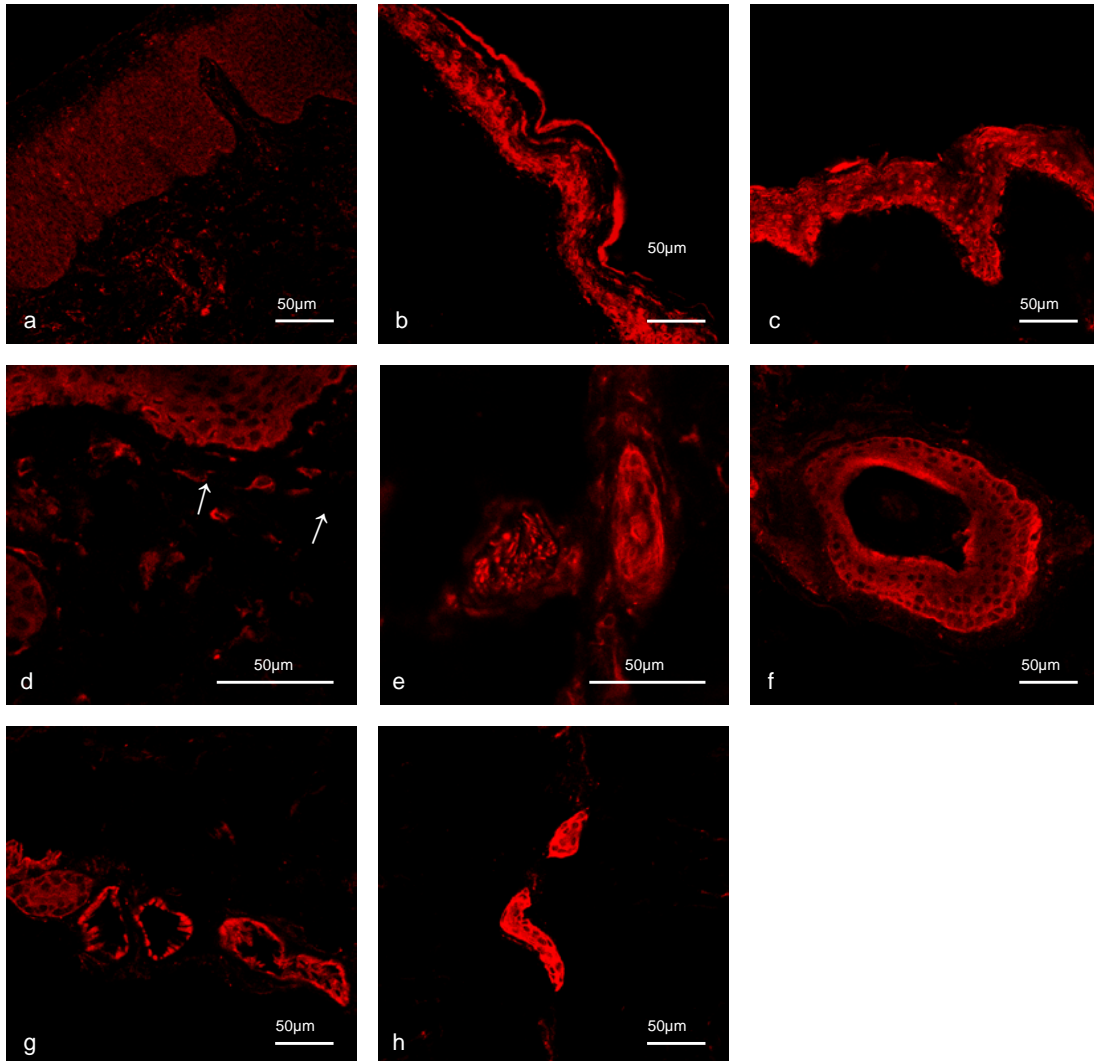


Abbildung B.5.: Lokalisation der nAChR $\alpha 10$ -Untereinheit in humaner Haut: mittels indirekter Immunhistochemie konnte die Lokalisation der $\alpha 10$ -IR in der (a) – Epidermis der läsionalen AD-Haut, der (b) Epidermis der non-läsionalen AD-Haut und der (c) Epidermis der Haut gesunder Probanden nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich $\alpha 10$ -IR in (d) subepidermalen dendritischen Zellen (Pfeil), in (e) dermalen Nervenfaserbündeln, in (f) Haarfollikeln, in (g) Drüsenazini (h) und Drüsenausführungsgängen ekkriner Drüsen.

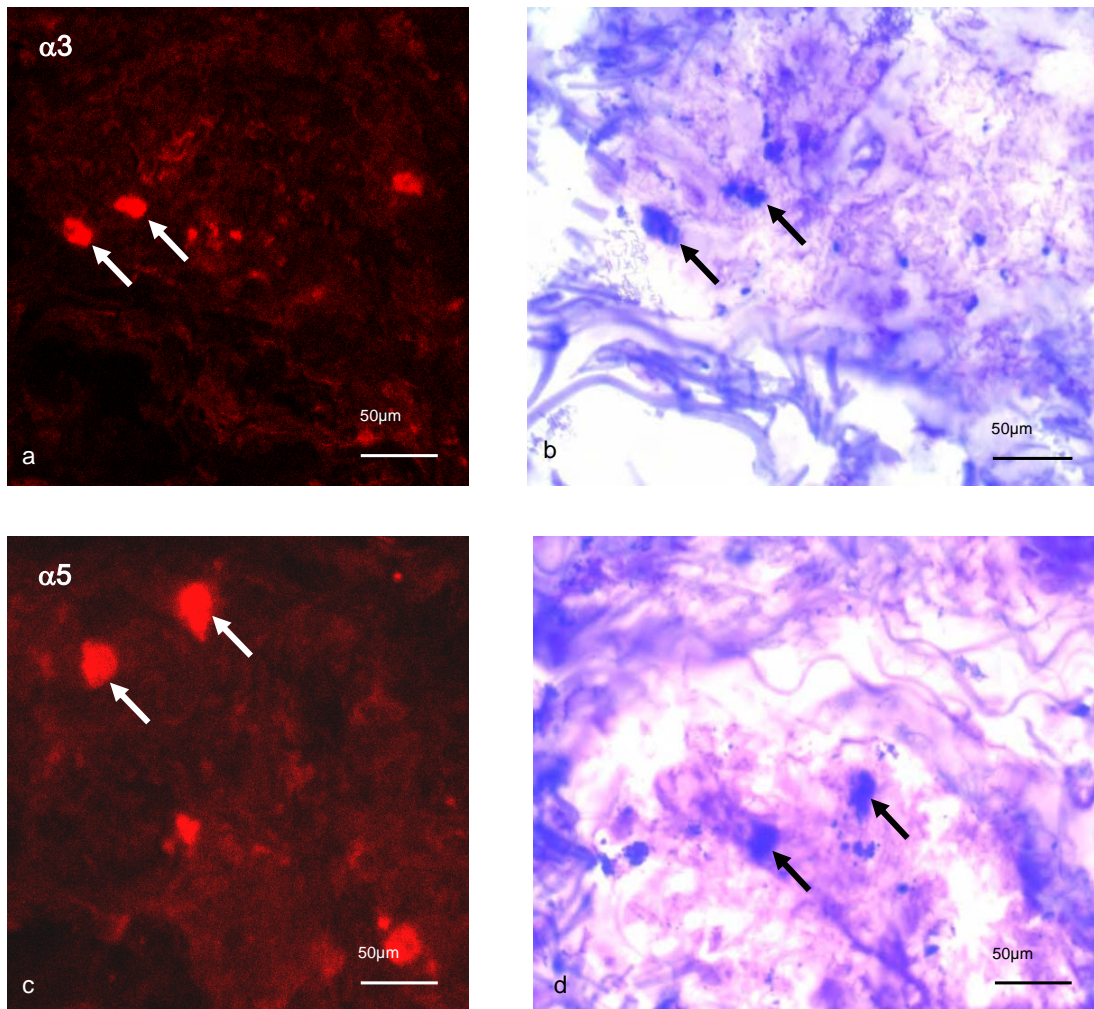


Abbildung B.6.: Mastzellnachweis in der läsionalen AD-Haut: Darstellung (a) – $\alpha 3$ -immunreaktiver (Pfeile) und (c) $\alpha 5$ -immunreaktiver (Pfeile) dermaler Mastzellen in läsionaler AD-Haut (P8) und (b), (d) positiver Mastzellnachweis mittels Toluidin-Blau-Färbung (Pfeile) in der läsionalen AD-Haut.

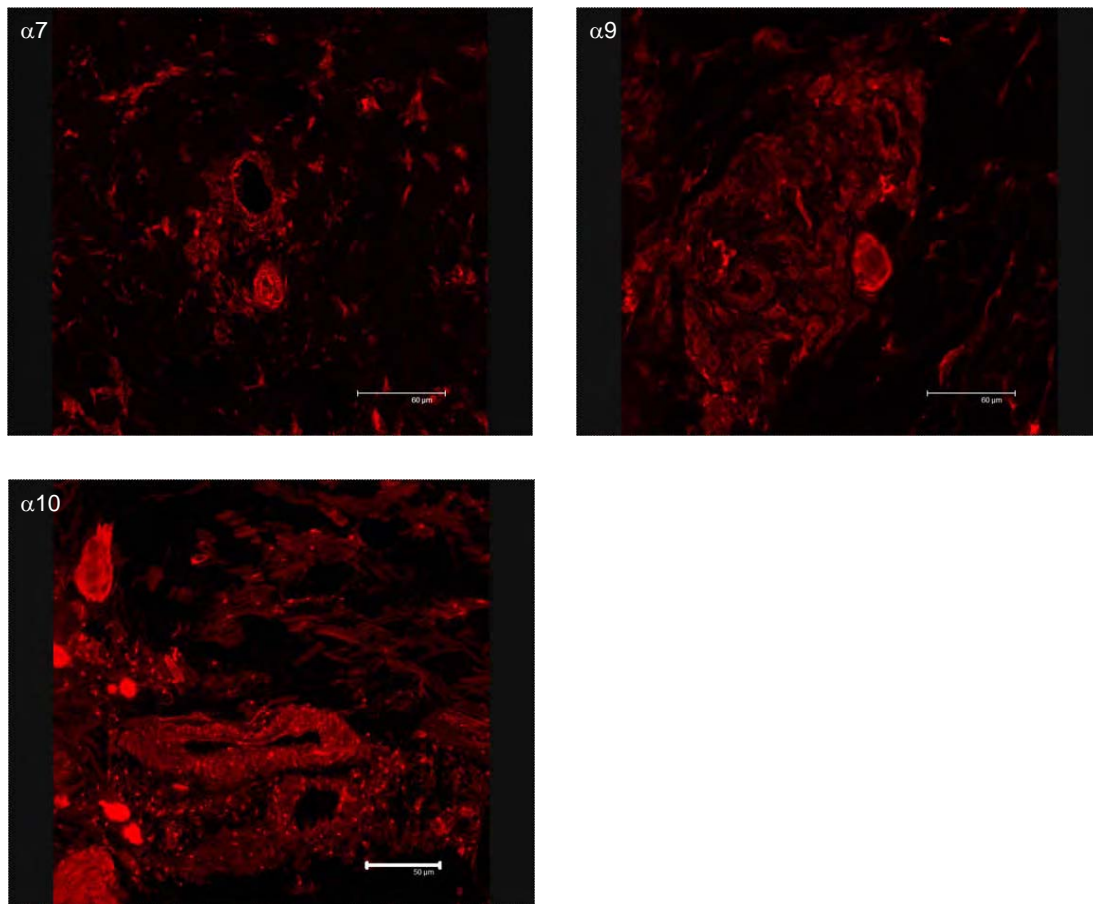


Abbildung B.7.: Immunkzellen im Bereich von Gefäßen der läSIONalen AD-Haut: Darstellung von (a) $\alpha 7$ -immunreaktiven (P21K) (b) $\alpha 9$ -immunreaktiven (P12K) und (c) $\alpha 10$ -immunreaktiven (P11K) Immunkzellen im Bereich der Gefäße in läSIONaler AD-Haut.

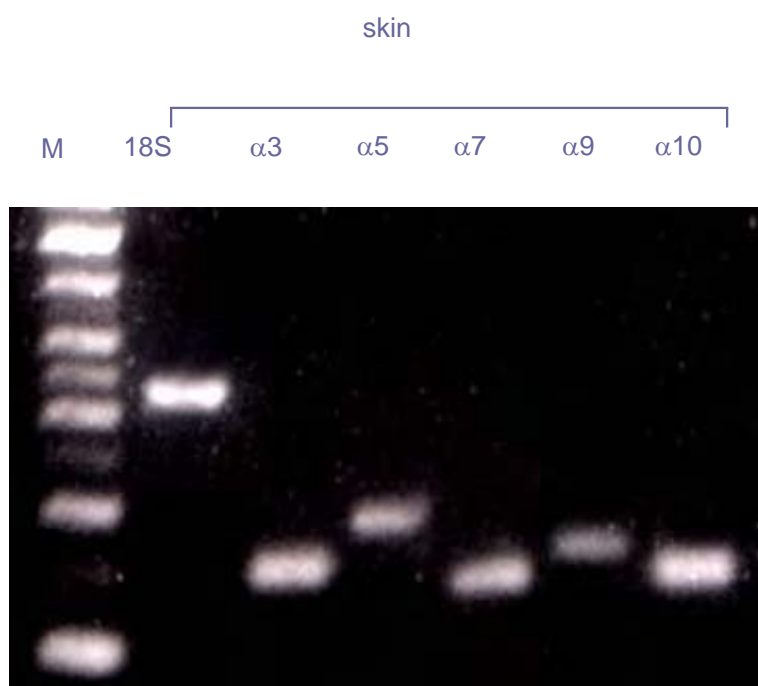


Abbildung B.8.: PCR der nAChR in der humanen Haut: Alle untersuchten Untereinheiten konnten in der humanen Haut sowohl bei Patienten mit atopischer Dermatitis als auch bei gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen werden. M: Mylon (Positivkontrolle für die PCR-Banden); 18S: House-keeping Gen; $\alpha 3$, 5, 7, 9 und 10: untersuchte nAChR-Untereinheiten

Danksagung

Mein Dank gilt den vielen Menschen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei

Herrn Priv.-Doz. Dr. Rainer V. Haberberger für die hervorragenden Ausbildung im Labor und die stets geduldige Anleitung dieser Dissertation.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Volker Niemeier für die tatkräftige und immer hilfsbereite Unterstützung bei der Betreuung der Probanden und bei der Erstellung des Fragebogens sowie für die herausragende Betreuung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die geduldigen und sehr hilfreichen Korrekturen an meiner Dissertation sowie die fachliche Betreuung im Labor.

der Arbeitsgruppe der Anatomie I für die Technische Unterstützung, insbesondere bei Silke Wiegand, Martin Bodenbenner und Petra Hartmann.

Herrn Dr. Christoph Löser und dem OP-Team der Hautklinik der Universität Giessen für die Unterstützung bei der Probengewinnung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Jörg Kupfer für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Dr. Jan Frese für die tatkräftige und geduldige Unterstützung bei der Textverarbeitung.

Publikationen

Paper:

-Intermedin: A Skin Peptide that Is Downregulated in Atopic Dermatitis. Kindt F, Wiegand S, Loser C, Niemeier V, Hsu SY, Steinhoff M, Kummer W, Gieler U, Haberberger RV; Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Giessen, Giessen, Germany; Department of Psychosomatic Medicine, University of Giessen, Giessen, Germany. Journal of Investigative Dermatology, 2007 Mar;127(3):605-13

-The nicotinic receptor-subunits 3, 5, 7, 9 and 10 are differentially regulated in atopic dermatitis skin F. Kindt, S. Wiegand, V. Niemeier, J. Kupfer, C. Löser, H. Kurzen, W. Kummer, U. Gieler, R. V. Haberberger; Institutes for Anatomy and Cell Biology, Departments of Dermatology and Andrology, and Psychosomatic Medicine, University of Giessen. Department of Dermatology University Medical Centre, Mannheim, Department of Anatomy and Histology, Flinders University of South Australia, Adelaide wurde im Oktober 2007 beim British Journal of Dermatology eingereicht

Vortrag

- The Nicotinic Receptor-Subunits 3, 5, 7, 9 and 10 are Differentially Regulated in Atopic Dermatitis Skin. 2. International Symposium on Non-Neuronal Acetylcholine vom 31.08.-02.09.2006 in Mainz. F. Kindt, S. Wiegand, C. Löser, V. Niemeier, H. Kurzen, W. Kummer, U. Gieler, R. V. Haberberger; Anatomy and Cell Biology, Dermatology and Andrology, Psychosomatic Clinic, Justus-Liebig-University Giessen; Dermatology, University Mannheim, Germany

Poster:

- Lokalisation der nikotinischen Rezeptor -Untereinheiten (3, 5, 7, 9 und 10) in gesunder und in an Neurodermitis erkrankter Haut. 43. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 20.-23.04.2005 in Dresden; F. Kindt, S. Wiegand, C. Löser, V. Niemeier, H. Kurzen, W. Kummer, U. Gieler, R. V. Haberberger; Institut für Anatomie und Zellbiologie, Dermatologie und Andrologie, Psychosomatische Klinik, Justus-Liebig-Universität Giessen; Dermatologie, Universität Mannheim, Deutschland 43. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesell-

schaft, 20.-23.04.2005 in Dresden.

- The nicotinic receptor alpha-subunits 3, 5, 7, 9 and 10 are differentially regulated in atopic dermatitis skin. 35. Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 22.-24.09.2005, Tübingen; F. Kindt, C. Löser, V. Niemeier, H. Kurzen, S. Wiegand, U. Gieler, R. V. Haberberger
Justus-Liebig-University, Anatomy and Cell Biology, Giessen, Justus-Liebig-University, Dermatology and Andrology, Giessen Justus-Liebig-University, Psychosomatic Clinic, Giessen, University Mannheim, Dermatology, Mannheim.

- Intermedin: A novel skin peptide that is down regulated in atopic dermatitis. Stress and Skin: Symposium on the Science of Dermatology, Cornell University of New York, USA 2.-4.06.2006. Friederike Kindt, Silke Wiegand, Christoph Löser, Volker Niemeier, Sheau Yu Teddy Hsu, Wolfgang Kummer, Uwe Gieler, Rainer Viktor Haberberger
Institute for Anatomy and Cell Biology, Department of Dermatology and Andrology, and Psychosomatic Medicine, University of Giessen, Division of Reproductive Biology, Department of Obstetrics and Gynecology, Stanford University School of Medicine.

Ich erkläre: *“Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‘Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis’ niedergelegt sind, eingehalten”*

Lebenslauf

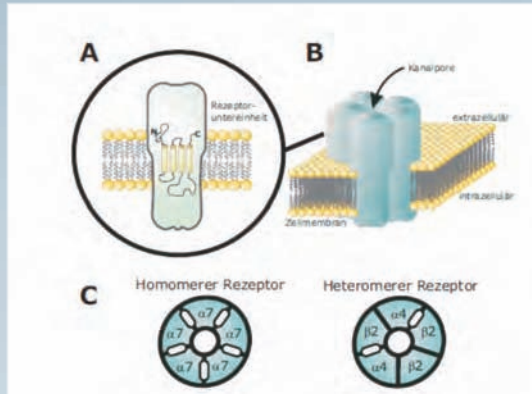
Friederike Magdalena Kindt

geboren am 18. November 1980

in Herdecke

1987 - 2000	Waldorfschule Hannover/Maschsee
Januar -	Besuch der Waldorfschule
Februar 1996	Yverdon, fanzösische Schweiz
August -	Besuch der Klein Forrest High School
Dezember 1997	in Houston, Texas, USA
Juni 2000	Abitur, Waldorfschule Hannover/Maschsee
September -	Beschäftigung als Aushilfskraft
Oktober 2000	im Jugendheim Hövelriege
November 2000	Beginn der Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der Johanniter-Schule in Ronnenberg
Dezember 2000-	Pflegepraktikum am Clementinenhaus
Januar 2001	in Hannover
März 2001	Abschluss der Rettungssanitäterausbildung
April 2001	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
April 2003	Physikum
September 2003	Beginn der Forschungsarbeit für die Dissertation bei PD Dr. R. Haberberger, Anatomisches Institut und PD Dr. V. Niemeier, Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie der JLU Giessen
September 2004	Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Sommerset Hospital in Kapstadt, Südafrika
Mai 2006	Zweites Staatsexamen nach neuer Ärztlicher Approbationsordnung

Juli - Oktober 2007 Approbation 02.06.2007
Stipendiatin des Endeavour-Programmes der
Australischen Regierung an der
Flinders University of Adelaide,
Australien



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5303-6



9 783835 1195303 1